

**UNTERSUCHUNGEN ZUR INAKTIVIERUNG DES
RHINOPNEUMONITISVIRUS BEI ERHALT
DER IMMUNISIERENDEN EIGENSCHAFTEN**

Regine Scheid

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr

UNTERSUCHUNGEN ZUR INAKTIVIERUNG DES
RHINOPNEUMONITISVIRUS BEI ERHALT
DER IMMUNISIERENDEN EIGENSCHAFTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität
München



von
Regine Scheid
aus
Hamburg

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Tiermedizin der Universität

München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr
Korreferent: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Tag der Promotion: 18. Juli 1975



Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM ÜBER IMPFSTOFFE GEGEN HERPES- VIRUSINFEKTIONEN IN DER TIERMEDIZIN	2
2.1. Impfstoffe gegen Rhinopneumonitis	4
2.1.1. Lebendimpfstoffe	5
2.1.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern	11
2.2. Impfstoffe gegen die Aujeszky'sche Krankheit	17
2.2.1. Lebendimpfstoffe	18
2.2.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern	22
2.3. Impfstoffe gegen die infektiöse bovine Rhinotracheitis - infektiöse pustulöse Vulvovaginitis	27
2.3.1. Lebendimpfstoffe	28
2.3.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern	34
2.4. Impfstoffe gegen die Marek'sche Geflügel- lähmung	38
2.4.1. Lebendimpfstoffe	39
2.4.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern	45
2.5. Impfstoffe gegen die infektiöse Laryngotracheitis	47
2.5.1. Lebendimpfstoffe	48
2.5.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern	55

2.6. Impfstoffe gegen die feline Rhino- tracheitis	56
2.6.1. Lebendimpfstoffe	57
2.6.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern	59
2.7. Impfstoffe gegen die Infektion mit caninem Herpesvirus	60
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	61
3.1. Material und Methoden	61
3.1.1. Virusstämme	61
3.1.2. Zellkulturen	61
3.1.3. Virusvermehrung	64
3.1.3.1. Einschnitt-Vermehrung	64
3.1.3.2. Züchtung und Gewinnung des Saatvirus	65
3.1.3.3. Virustitration	67
3.1.4. Virusinaktivierung	68
3.1.4.1. Thermoinaktivierung	68
3.1.4.2. Inaktivierung mit Betapropiolakton (BPL)	69
3.1.4.3. Inaktivierung mit Acetyl- äthylenimin (AEI)	72
3.1.4.4. Überprüfung des Inakti- vierungserfolges in der Zellkultur	73
3.1.5. Immunisierung	74
3.1.5.1. Versuchstiere	74
3.1.5.2. Immunisierungsplan	74
3.1.5.3. Blutentnahmen und Serum- gewinnung	77

	Seite
3.1.6. Challenge-Infektion	79
3.1.7. Antikörpernachweis in den immuni- sierten Versuchstieren	81
3.1.7.1. Serumneutralisationstest (SN-Test)	81
3.1.7.2. Komplementbindungs- reaktion (KBR)	83
3.2. Ergebnisse	86
3.2.1. Zellkulturen	86
3.2.2. Einschnitt-Vermehrung	87
3.2.3. Gewinnung des Saatvirus	89
3.2.4. Virusinaktivierung	91
3.2.4.1. Thermoinaktivierung	91
3.2.4.2. Inaktivierung mit Beta- propiolakton (BPL)	94
3.2.4.3. Inaktivierung mit Acetyläthylenimin (AEI)	97
3.2.5. Immunisierung von Hamstern und Challenge-Infektion	101
3.2.5.1. Thermoinaktiviertes Rhinopneumonitisvirus als Immunisierungsentigen	102
3.2.5.2. BPL-inaktiviertes Rhino- pneumonitisvirus als Immunisierungsentigen	105
3.2.5.3. AEI-inaktiviertes Rhino- pneumonitisvirus als Immunisierungsentigen	115
3.2.5.4. Vermehrungsfähiges Rhino- pneumonitisvirus als Immunisierungsentigen	129

	Seite
3.2.5.5. Challenge-Infektion	131
3.2.6. Immunisierung von Meerschweinchen	138
4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	141
5. ZUSAMMENFASSUNG	156
6. LITERATURVERZEICHNIS	158
LEBENS LAUF	

1. EINLEITUNG

Die Rhinopneumonitis ist weltweit verbreitet. In vielen Ländern Europas und Amerikas kommt sie seit Jahren enzootisch vor. Bei jungen Pferden verursacht sie respiratorische Erkrankungen, bei Stuten Aborte. Häufig treten klinisch inapparente Infektionen auf, wobei das Virus ebenso wie bei erkrankten Pferden über einen gewissen Zeitraum ausgeschieden wird. Damit sind unsichtbare Quellen vorhanden, die immer wieder zu neuen Infektionen führen.

Seit 1968 wird in der BRD mit einem von MAYR und PETTE (126, 128) und MAYR u.M. (129) entwickelten Lebendimpfstoff gegen die Rhinopneumonitis prophylaktisch geimpft. Mittlerweile ist ein absteigender Trend der Rhinopneumonitis hinsichtlich der Morbidität zu beobachten, so daß diese Bekämpfungsmaßnahme als erfolgreicher erster Schritt in einem generellen Eradikationsprogramm aufzufassen ist. Der zweite Schritt bei der Bekämpfung einer enzootischen Infektion durch Immunprophylaxe erfordert - nach Verdrängung des Feldvirus durch das Impfvirus - den Einsatz eines Impfstoffes aus inaktivierten Erregern.

Aufgabe vorliegender Arbeit ist es, verschiedene Inaktivierungsverfahren zu überprüfen, die eine Immunisierung mit dem inaktivierten Virus nach entsprechender Konzentrierung ermöglichen.

2. SCHRIFTTUM ÜBER IMPFSTOFFE GEGEN HERPESVIRUSINFEKTIONEN IN DER TIERMEDIZIN

Herpesviren nehmen unter den Krankheitserregern bei Mensch und Tier auf Grund ihrer Fähigkeit, sich in verschiedenen Organsystemen zu manifestieren, eine besondere Stellung ein. In den Tierhaltungen aller Länder haben Herpesvirusinfektionen mit ausgeprägtem Seuchencharakter zu großen wirtschaftlichen Verlusten geführt. Die wichtigsten sind die Rhinopneumonitis des Pferdes, die Aujeszky'sche Krankheit des Schweines, die infektiöse bovine Rhinotracheitis - infektiöse Vulvovaginitis (IBR - IPV) des Rindes sowie schließlich die Mareksche Erkrankung und die infektiöse Laryngotracheitis (ILT) des Geflügels. Auch bei kleinen Haustieren finden wir Herpesvirusinfektionen: bei der Katze die feline Rhinotracheitis, beim Hund die Infektion mit dem caninen Herpesvirus. Die Entwicklung und der Einsatz von Lebendimpfstoffen gegen die Herpesvirusinfektionen der Haustiere ist sinnvoll in all den Ländern, in denen die entsprechende Seuche bodenständig ist und eine starke Ausbreitungstendenz besitzt. Der Einsatz von Lebendimpfstoffen führt zu einem gefahrlosen "Leben mit dem Erreger", d.h. Mortalität und Morbidität werden signifikant gesenkt. Die virulenten Feldstämme werden durch schwach- oder avirulente Impfstämme mehr und mehr verdrängt. Das Infektionsgeschehen wird dadurch aber nicht "eliminiert", sondern lediglich in andere Bahnen gelenkt, insofern, als Erkrankungen verhindert werden. Ein derartiger Erfolg kann über

die Impfung aber nur erreicht werden, wenn alle Tiere eines verseuchten Bestandes geimpft werden und keine Impflücken entstehen (124).

In Ländern, in denen die entsprechenden Herpesvirusinfektionen nicht bodenständig sind, und in den Ländern, in denen die Feldvirusinfektionen durch konsequenten Einsatz von Lebendimpfstoffen verdrängt werden konnten, ist eine Impfung mit Vakzinen aus inaktivierten Erregern vorzuziehen. Die Entwicklung von Impfstoffen aus inaktivierten Herpesviren stößt jedoch auf erhebliche Schwierigkeiten: Herpesviren verlieren bei der Inaktivierung neben ihrer Infektiosität auch leicht ihre immunisierende Aktivität.

Die Herpesimmunität kommt weniger infolge Bildung humoraler Antikörper zustande; sie ist vielmehr bedingt durch zellständige Mechanismen, so z.B. Bildung von Immunzellen und von lokalen sekretorischen Antikörpern (124, 196). Inaktivierte Viren stimulieren aber leichter die Bildung von humoralen Antikörpern als die von zellständigen Immunreaktionen.

Auf Grund der genannten Schwierigkeiten finden wir in der Tiermedizin bis heute kaum einen ein-satzfähigen Impfstoff aus inaktivierten Herpesviren, lediglich bei der Bekämpfung der infektiösen bovinen Rhinotracheitis - infektiösen pustulösen Vulvovaginitis des Rindes wird derzeit der Einsatz einer derartigen Vakzine diskutiert.

2.1. Impfstoffe gegen Rhinopneumonitis

Die Rhinopneumonitis führt bei Fohlen zu respiratorischen Erkrankungen und bei tragenden Stuten zum Abort.

Bereits zu einer Zeit, da sich unter dem klinischen Bild der sogenannten "katarrhalischen Influenza" ätiologisch sowohl Pferdeinfluenza- als auch Rhinopneumonitisvirusinfektionen verbargen, stellten MANNINGER und CSONTOS (119) fest, daß hygienische Maßnahmen zur Bekämpfung dieser Erkrankung allein nicht ausreichen. Sie wiesen auf die Notwendigkeit hin, prophylaktische Maßnahmen in Form von aktiver Immunisierung in das Bekämpfungsprogramm einzubeziehen.

2.1.1. Lebendimpfstoffe

Erste Immunisierungsversuche mit vermehrungsfähigem Virus sind von DIMOCK u.M. (50) mittels infektiöser Seren und infektiösen Pleuralexsudats durchgeführt worden; sie konnten in Feldversuchen bei Pferden zwar eine Antikörperbildung stimulieren, die Art des verwendeten Ausgangsmaterials ließ jedoch auf Grund seiner allergenen Wirkung einen Einsatz dieser Impfstoffe auf breiter Basis nicht zu.

Über Versuche, einen Lebendimpfstoff aus Organmaterial abortierter Foeten bzw. Organmaterial und Blut erkrankter und gestorbener Pferde zu entwickeln, berichten MANNINGER (114, 115, 116, 117), BRUNER u.M. (30, 31), JONES u.M. (84), DOLL u.M. (55) und BARTHA u.M. (3). Allergische und toxische Reaktionen (3, 84), mangelnde Belastbarkeit der Immunität bei den Impflingen (51, 55) sowie durch die Impfung provozierte Aborte, die Impferkrankungen darstellen (31), veranlaßten DOLL u.M. (56) und BRYANS und DOLL (33) das Rhinopneumonitisvirus über fortlaufende Hamsterpassagen in seiner Virulenz soweit abzuschwächen, daß es als Grundlage eines Lebendimpfstoffes in Frage kam. In den folgenden Jahren entwickelten sie auf dieser Basis eine Lebendvakzine unter Verwendung virushaltiger Hamsterlebern (50.-100.Hamsterpassage des Stammes Ky-D) und überprüften sie beim Pferd (51, 57, 58). Nach intranasaler Inokulation entstand bei Jungpferden eine serologisch nachweisbare Immunität, die jedoch nur kurze Zeit anhielt, und die bereits 10 Wochen p.vacc. gegenüber einer Reinfektion keinen Schutz

mehr bot. Nach 3-4 maliger Vakzination reagierten die Jungpferde immunologisch und klinisch ähnlich wie erwachsene Pferde, die wiederholt einer natürlichen Infektion ausgesetzt waren. Auch die Dauer der Immunität war vergleichbar derjenigen nach natürlicher Infektion (58). Mit dieser Lebendvakzine (51, 57), die während 5 Jahren bei 9480 Stuten eingesetzt worden war, konnte der Prozentsatz der Abortfälle von 15 % in nicht geimpften Beständen auf 0,93 % in geimpften Beständen reduziert werden. Bei 0,3 % von 6680 tragenden Stuten wurden durch die Impfung noch Aborte ausgelöst (59). BRYANS (32) weist auf die Abortgefahr nach Impfung tragender Stuten hin, die sich noch nicht im Verlaufe einer natürlichen Infektion mit dem Rhinopneumonitisvirus auseinandergesetzt haben. Grundsätzlich empfiehlt er eine Impfung von Stuten nur im frühen Trächtigkeitsstadium. Von DOLL und BRYANS (59, 60) wurde dann folgendes Impfprogramm empfohlen: Alle Pferde eines Bestandes - ohne Berücksichtigung des Alters der Impflinge und des Trächtigkeitsstadiums bei Stuten - sollten 2 mal jährlich im Juli und Oktober geimpft werden; dabei wird die Vakzine in einer Dosis von 3 ml intranasal appliziert. Die Verfasser machen ausdrücklich darauf aufmerksam, daß dieser Impfstoff nur in endemisch verseuchten Gebieten eingesetzt werden darf und in Beständen, in denen die Stuten während der Monate Februar bis Juni gedeckt werden.

Nach diesem Immunisierungsplan sind in den letzten Jahren in endemisch verseuchten Gebie-

ten der USA zahlreiche Pferde mit der Hamster-Lebendvakzine geimpft worden. Wegen der Gefahr von Impferkrankungen konnte sich diese Lebendvakzine jedoch nicht durchsetzen. Aus diesem Grunde entwickelten MAYR und PETTE (126) 1966 eine Zellkulturvakzine auf der Basis eines durch zahlreiche Passagen in Schweinenierenzellkulturen attenuierten Virus. Sie benutzten hierfür den an Hamster adaptierten Rhinopneumonitis-virusstamm RAC-H. Das attenuierte Zellkulturvirus erzeugte nach intramuskulärer und intranasaler sowie nach intravenöser Applikation beim Pferd lediglich einen biphasischen Temperaturanstieg am 1.-2. und 8.-9. Tag p.vacc. (146). Die nach der Impfung gebildeten neutralisierenden Antikörper persistierten bis zum 6. Monat p.vacc. In der Folgezeit ist dieser Impfstoff eingehend auf Unschädlichkeit und Wirksamkeit unter Versuchs- und Praxisbedingungen überprüft worden (129). Weder bei Fohlen noch bei tragenden Stuten wurden Krankheitserscheinungen nach der Impfung beobachtet. Auch eine 5-malige Wiederholung der Vakzination von Stuten führte nicht zu Impfkomplikationen. Selbst im 7.-9. Trächtigkeitsmonat geimpfte Stuten fohten zum errechneten Termin normal ab. Aus Lebern, Lungen und Milzen zweier Fohlen von Stuten, die in den letzten Trächtigkeitsmonaten geimpft worden waren, sowie aus Nachgeburts teilen solcher Stuten konnte kein Impfvirus reisoliert werden. Lediglich nach intranasaler/intramuskulärer Applikation wurde das Impfvirus am 2.-4. Tag p.vacc. über den Nasenrachenraum ausgeschieden. Das ausgeschiedene Impfvirus war nicht mehr in

der Lage, ungeimpfte Kontrollpferde per Kontakt zu infizieren.

Die Wirksamkeit der Vakzine wurde mittels serologischer Untersuchungen überprüft. Bei Fohlen (intranasal geimpft) kam es nach Reimmunisierung zu einem signifikanten Anstieg der neutralisierenden Antikörper. Stuten, die i.m. oder i.n./i.m. vakziniert worden waren, bildeten 14 Tage p.vacc. neutralisierende Antikörper bis 1:45; diese Titer persistierten bis zum 6. Monat nach der Impfung. Durch Reimmunisierung kam es zu einem deutlichen Boostereffekt; die Antikörper persistierten daraufhin bis zu 11 Monaten. Auch eine Übertragung der durch die Impfung induzierten maternalen, neutralisierenden Antikörper über das Kolostrum auf Fohlen ließ sich nachweisen. Die präkolostralen Antikörpertiter der Fohlen lagen unter der Grenze der Nachweisbarkeit; bis zum Alter von 3 Wochen hatten die Saugfohlen Titer bis 1:32, die dann langsam absanken und im 3. Lebensmonat nicht mehr nachzuweisen waren.

Seit Herbst 1968 wird in der BRD mit diesem attenuierten Lebendimpfstoff erfolgreich geimpft. Der kommerzielle Impfstoff besteht aus dem über 250-300 Passagen in Schweinenierenkulturen attenuierten Stamm RAC-H des Rhinopneumonitisvirus. Er enthält nach Lyophilisation 10^7 - $10^{7,5}$ KID₅₀/ml und wird in einer Dosis von 5 ml intramuskulär (auch subkutane Impfung ist möglich) appliziert. Folgendes Impfprogramm hat sich dabei bewährt: (124, 125, 127, 128, 129, 195, 196): Grundsätzlich ist die Bekämpfung der Rhinopneumonitis nur dann erfolgversprechend, wenn alle Pferde eines Bestandes

ständig unter Impfschutz gehalten werden. Fohlen sollten nach Abklingen der passiven Immunität im 2.-3. Lebensmonat erstmalig vakziniert und im Abstand von 3-4 Monaten revakziniert werden. Auch bei Hengsten und Stuten soll die Impfung 2 mal im Abstand von 3-4 Monaten durchgeführt werden; tragende Stuten werden im 2.-3. und im 6.-7. Trächtigkeitsmonat vakziniert. Zur Aufrechterhaltung des Impfschutzes genügt eine einmalige jährliche Auffrischungsimpfung - bei tragenden Stuten im 6.-7. Trächtigkeitsmonat. Auch eine Notimpfung kann unbedenklich durchgeführt werden. Hierbei sind alle Pferde eines Bestandes einschließlich der tragenden Stuten bis zum 9. Trächtigkeitsmonat zu impfen. Bei Stuten bis zum 5. Trächtigkeitsmonat sollte im Abstand von 12 Wochen reimmunisiert werden. Nach der Abfohlperiode kann dann der Bestand in das Schutzimpfungsprogramm übergeführt werden.

Die Vakzination mit der Zellkulturvakzine erwies sich sowohl zur Bekämpfung der respiratorischen als auch der Abortform der Rhinopneumonitis als geeignet. Die bisher gemachten Erfahrungen zeigen, daß es bei konsequentem Einsatz dieses Impfstoffes durchaus möglich ist, die Pferdepopulation gegenüber Feldinfektionen zu schützen.

Der von MAYR und PETTE (126) in Schweinenierenzellkulturen attenuierte Stamm wird inzwischen auch in Amerika zur Herstellung eines Lebendimpfstoffes gegen die Rhinopneumonitis verwendet; das Virus wird in einer stabilen Pferdenierenzelllinie (NL-Eq 4) gezüchtet (6).

KUBIN und KÖLBL (106) hatten im Jahre 1969 einen

Rhinopneumonitisvirusstamm "Be" an primäre Ferkelhodenzellen adaptiert. Für die Produktion des Impfstoffes verwendeten sie die Passagen 53, 55 und 56. Hiermit wurden erfolgreich junge Pferde und trächtige Stuten immunisiert, die Verfasser können die Frage nach der Ungefährlichkeit des verwendeten Impfstoffes für tragende Stuten jedoch nicht eindeutig beantworten. 1974 wurden von SHIMIZU u.M. (176) vergleichende Immunisierungsversuche mit zwei vermehrungsfähigen Rhinopneumonitisvirusstämmen an Fohlen durchgeführt. Der an Hamster adaptierte und attenuierte Stamm Ky-B verursachte in den Impflingen nach Angaben der Verfasser geringere Symptome einer Rhinopneumonitiserkrankung als der japanische Stamm H-45; die Antikörperstimulation war jedoch nach Applikation des Ky-B-Stammes ausgeprägter. Ein Immunschutz gegenüber einer Challenge-Infektion mit dem virulenten Stamm HH-1 bestand bei allen vakzinierten Fohlen "mehr oder weniger", die mit dem Stamm Ky-B immunisierten Fohlen waren "fast vollständig" geschützt. Die gleichen Autoren wendeten eine kombinierte Vakzination mit vermehrungsfähigem und inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus in Immunisierungsversuchen an Fohlen und Stuten an (siehe Kapitel 2.1.2. "Impfstoffe aus inaktivierten Erregern").

2.1.2 Impfstoffe aus inaktivierten Erregern

Ähnlich wie die ersten Versuche zur Herstellung eines Lebendimpfstoffes gegen den Virusabort der Stuten wurden Versuche zur Inaktivierung des mutmaßlichen Erregers und seiner Verwendung als Impfstoff zu einer Zeit vorgenommen, zu der die Ätiologie der Erkrankung noch nicht geklärt war. MANNINGER und CSONTOS (119) bezeichneten den Virusabort noch als "verderbliche Folge einer Influenzaerkrankung des Muttertieres". Im Jahre 1946 versuchte KRESS (104) erstmalig, einen Impfstoff gegen den Stutenabort aus inaktivierten Erregern herzustellen. Er zerkleinerte hierfür Organe abortierter Pferdeföten, schwemmte sie in physiologischer Kochsalzlösung auf und versetzte 1 l dieses Gemisches mit 4 ml Formaldehyd. Nach 4 Stunden Schütteln und 48 Stunden Inkubation bei +37°C wurde das heterogene Organgemisch durch Gaze filtriert und erneut für 48 Stunden bei +37°C inkubiert. In orientierenden Versuchen wurden zunächst trächtige Meerschweinchen subkutan mit 1 ml dieser Vakzine geimpft und 21 Tage p.vacc. mit 1 ml "stark virushaltigen" Mageninhalts eines abortierten Pferdefötus infiziert. Alle Meerschweinchen gebaren normal. In Pferdeversuchen wurden dann bis zu 100 ml des Impfstoffes subkutan ohne Rücksicht auf das bestehende Trächtigkeitsstadium verabfolgt. Die Verfohlziffer konnte auf diese Art und Weise von 30,56 % bei 373 nicht geimpften trächtigen Stuten auf 1,93 % bei den noch verbliebenen und immunisierten 259 trächtigen Stuten reduziert werden. Postvakzinale Komplikationen traten nicht auf. Spä-

ter hat man dann im Abstand von 8 - 10 Tagen 30 bzw. 40 ml der Vakzine appliziert. In dieses Impfprogramm bezog man aber nur die trächtigen Mutterstuten gefährdeter Bestände ein. Einen ähnlichen Organ-Formalinimpfstoff beschrieben 1948/49 BRUNER u.M. (30, 31). Als Ausgangsmaterial dienten virushaltige fötale Pferdeorgane. Bei Einsatz derartiger Vakzinen kam es jedoch bei Fohlen häufig zu hämolytischem Ikterus (52, 53). Ein weiterer Nachteil der Vakzine bestand darin, daß häufig lediglich komplementbindende, nicht aber neutralisierende Antikörper gebildet wurden.

Besonders eingehend hat sich die Arbeitsgruppe um DOLL und BRYANS (54, 56, 57, 58) mit dem Problem der Impfstoffherstellung aus inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus beschäftigt. Sie verwendeten zunächst formalininaktivierte (0,35 % Formalin) virushaltige Organsuspensionen von Lungen abortierter Föten (54). Die Seren der immunisierten Stuten untersuchten sie auf neutralisierende sowie komplementbindende Antikörper. Nach 3-maliger intradermaler Applikation der Vakzine im Abstand von 1 Woche stellten sie fest, daß eine Dosis von 5 ml wesentlich höhere Titer zur Folge hatte als eine Applikation von 0,5 und 1 ml. 2 Wochen nach der ersten Vakzination waren die höchsten Titer zu beobachten. Diese sanken jedoch rasch ab und erreichten 4 Wochen nach der letzten Vakzination nahezu die prävakzinalen Werte. In einem Parallelversuch wurde der Abstand der Vakzinationen auf 2 Wochen verlängert, wieder war die Antikörperstimulation nach Gabe

von 5 ml am ausgeprägtesten, die erreichten Titer waren jedoch geringer als nach Applikation der Vakzine in einwöchigen Abständen.

In späteren Versuchen (56) dienten als Impfstoffgrundlage Hühnerembryonen und Lebern von Hamstern, die mit einer letalen Dosis des Rhinopneumonitisvirusstammes Ky-D infiziert worden waren, sowie Lungen- und Lebermaterial von abortierten Pferdeföten (Inaktivierung mit Formalin). Als Parameter für die Immunogenität des verwendeten Virusausgangsmaterials galt die Schutzwirkung in Hamstern, die mit Verdünnungen der Vakzinen immunisiert und 2 Wochen danach einer Belastungsinfektion mit 10^7 - 10^8 LD₅₀ des Ky-D-Stammes ausgesetzt worden waren. Mit der Vakzine auf der Basis von virushaltigen Hamsterlebern erzielte man die besten Ergebnisse, Vakzinen aus Organen abortierter Pferdeföten hatten eine geringe Wirkung, während die Hühnerembryo-Vakzinen total versagten. Als optimale Formalinkonzentration für die Inaktivierung des Rhinopneumonitisvirus aus infizierten Hamsterlebern wurde 0,4 % Formalin ermittelt. Da das inaktivierte Virus bei einer Lagerungstemperatur von +4°C rasch an Immunogenität verlor (54 % innerhalb von 27 Tagen), versuchten die Autoren - allerdings erfolglos -, durch Zusatz von Konservierungsmitteln (0,5 % Phenol in Äther, 0,5 % Phenol in Chloroform, 0,5 % Chlorobutanol in Äther) die Vakzine zu stabilisieren. Nach Hitzeinaktivierung bei +56°C während 10 Minuten beobachteten sie einen rapiden Verlust der immunisierenden Fähigkeiten des Virus. Auch Inaktivierungen mit Glyoxal (1, 2, 4, 6 mg/ml), Ketoxal (1, 2,

4 mg/ml) und Betapropiolakton (0,1/ 0,2/ 0,3/ 0,4 %) brachten schlechte Ergebnisse.

Mit formalininaktivierten Vakzinen aus Hamsterlebern wurden 22 Fohlen mit je 5 ml s.c. 3 mal im Abstand von 3 Wochen geimpft. 15 der vakzinierten Fohlen reagierten mit einem deutlichen Anstieg der neutralisierenden Antikörper, bei 7 Fohlen wurde der prävakzinale Titer durch die Impfung nicht beeinflusst. Die prävakzinalen Durchschnittstitern neutralisierender Antikörper lagen nach DOLL und BRYANS (58) bei $10^{3,7}$. Nach der Vakzination war ein durchschnittlicher Titeranstieg von 0,8 log zu beobachten. Weiteren 10 Fohlen wurde das inaktivierte Virus in einer Dosis von 10 ml 3 mal in 1 wöchigem Abstand i.m. appliziert. 2 Wochen nach der letzten Applikation wurde eine Challenge-Infektion mit Lungenverreibungen infizierter Feten (Stamm Ky-B) durchgeführt. Keines der immunisierten Tiere blieb nach dem Challenge gesund. Es entwickelten sich Fieber, Leukopenie und Rhinitis. Serologisch kam es zu einem Anstieg der neutralisierenden Antikörper.

1974 berichteten SHIMIZU u.M. (178) über Immunisierungsversuche bei Fohlen mit betapropiolakton-inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus. Als Virusausgangsmaterial dienten virushaltige Hamsterlebern (Stamm Ky-D); das Material wurde durch Aluminiumphosphatzusatz und anschließende hochtourige Zentrifugation gereinigt. Mit dieser Vakzine sind Fohlen 2 mal im Abstand von 4 Wochen mit je 10 ml geimpft worden. Die Wirksamkeit wurde serologisch kontrolliert. Ein Antikörperanstieg trat nur bei

Fohlen auf, die bereits eine natürliche Rhinopneumonitisinfektion überstanden hatten. Fohlen, die sich noch nicht mit dem Virus auseinandergesetzt hatten, blieben dagegen serologisch negativ. Aufgrund dieser Ergebnisse arbeiteten SHIMIZU u.M. (177) ein kombiniertes Impfstoffverfahren aus, bei dem die Tiere zuerst mit Lebendimpfstoffen und dann mit Vakzinen aus inaktivierten Erregern geimpft wurden. Die Grundimmunisierung der Fohlen wurde 2 mal im Abstand von 4 Wochen durch intranasale Impfung mit Lebendimpfstoff (Stamm H-45) durchgeführt. Im Abstand von 3 Wochen erfolgte dann eine zweimalige Nachimpfung mit einem Impfstoff aus inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus (i.m.). Die erste Applikation des vermehrungsfähigen bzw. des inaktivierten Virus führte jeweils zu einem Anstieg der neutralisierenden und komplementbindenden Antikörper, die jeweilige zweite Applikation hatte keinen Boostereffekt. 4 Wochen nach abgeschlossener Immunisierung wurden die Impflinge intranasal mit virulentem Rhinopneumonitisvirus testinfiziert; die geimpften Fohlen blieben gesund, während die nichtgeimpften Kontrolltiere an Rhinopneumonitis erkrankten.

KAWAKAMI u.M. (89) prüften die oben beschriebene kombinierte Vakzination auch bei hochträchtigen Stuten. Nach 1-maliger Impfung mit Lebendvakzine wurden die Tiere 2 mal mit inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus geimpft (genaue Impfdaten liegen nicht vor). Die 2 Wochen nach abgeschlossener Vakzination durchgeführte Belastungsinfektion fiel in das letzte Trächtigkeitsstadium. Die ge-

impften Stuten fehlten zum errechneten Zeitpunkt normal ab, während 5 nichtgeimpfte trächtige Kontrollstuten auf die Challenge-Infektion mit respiratorischen Symptomen reagierten und darüberhinaus 3 dieser Stuten abortierten. Aus den abortierten Föten wurde das Rhinopneumonitisvirus isoliert.

Nach Einsatz von Vakzinen aus inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus auf der Basis von Organmaterial abortierter Pferdeföten wurden Unverträglichkeitsreaktionen beobachtet (148); darüber hinaus besitzen alle bisher erprobten Rhinopneumonitis-Impfstoffe aus inaktivierten Erregern unabhängig von der Art des verwendeten Ausgangsmaterials schlechte immunisierende Eigenschaften und führen bei parenteraler Verabreichung nur zu einer humoralen Immunität (124). In Einzootiegebieten wurde durch Einsatz derartiger Impfstoffe die Häufigkeit des Auftretens von Rhinopneumonitisinfektionen bei Jungpferden und von Virusaborten bei Stuten nicht eingeschränkt (51, 58, 124).

2.2. Impfstoffe gegen die Aujeszkysche Krankheit

Die Aujeszkysche Krankheit kommt bei Rindern, Pferden, Schweinen, Schafen, Ziegen, Hunden, Katzen und wildlebenden Tieren wie Ratten, Nerzen und Füchsen vor.

Seuchenmäßig belastet sie vor allem Schweinehaltungen und führt dort in den verschiedensten Ländern zu großen wirtschaftlichen Schäden.

Eine Immunprophylaxe gegen die auch als Pseudowut bezeichnete Krankheit ist deshalb vor allem beim Schwein entwickelt worden. Aujeszky-Impfstoffe für Schafe und Rinder werden vornehmlich zur Notimpfung eingesetzt, da für diese Tiergattungen hauptsächlich Schweine als Überträger in Frage kommen, sie selbst jedoch die Endkette der jeweiligen Infektkette darstellen. Auf Grund des hohen Verseuchungsgrades in osteuropäischen Ländern und der DDR haben sich mit Impfstoffen gegen die Aujeszkysche Krankheit besonders ungarische, tschechoslowakische, bulgarische und in der DDR arbeitende Forschergruppen befaßt. In diesen Ländern ist die Impfung wegen der enzootischen Seuchenlage erforderlich, während man in der BRD, in der bisher klinische Fälle nur sporadisch in den nördlichen Bundesländern auftraten (181), von einer allgemeinen Vakzinierung gegen die Pseudowut noch absieht.

2.2.1. Lebendimpfstoffe

Die erste praxisreife Lebendvakzine gegen die Aujeszky'sche Krankheit stammt von BARTHA und KOJNOK (4). Mittels Plaqueklonisierung gewann BARTHA (2) 1962 einen sogenannten "K"-Stamm aus infizierten Scheinierenkulturen, der sich durch geringe Cytopathogenität, reduzierte Virulenz für Kaninchen und fehlende Virulenz für Schweine, Schafe sowie Rinder auszeichnete.

Die Vermehrung des "K"-Stammes zum Zwecke einer Impfstoffherstellung erfolgte in Hühnerembryo-fibroblastenkulturen. Für die Untersuchung der Wirksamkeit und Unschädlichkeit wurden Schweine und Schafe eingesetzt. Nach einmaliger Impfung mit 2 ml der Vakzine reagierten die Schweine 3 Wochen p.vacc. zwar serologisch negativ, erkrankten aber nach intratrachealer Challenge-Infektion nicht; es kam lediglich zu einem Temperaturanstieg auf 40°C. Bei den geimpften Schafen starben nach dem Challenge dagegen 3 von 8 Tieren. Durch Revakzination konnte sowohl beim Schwein als auch beim Schaf die Wirksamkeit der Impfung stark verbessert werden. Alle Tiere bildeten virusneutralisierende Antikörper (Titer bis 1:32), und die Belastungsinfektion rief keinerlei klinische Reaktionen mehr hervor. Mit diesem Impfstoff sind dann in einem ersten Feldversuch in Ungarn 100 000 Schweine geimpft worden. Nach jährlicher Revakzination traten in den geimpften Beständen keine Erkrankungen mehr auf, darüberhinaus konnte eine Notimpfung bei Neuausbrüchen in nichtgeimpften Beständen die Seuche innerhalb von 10 Tagen stoppen. Über Impferkrankungen und

sonstige Komplikationen liegen keine Angaben vor. Dieser von BARTHA (2) entwickelte "K"-Stamm ist auch die Grundlage eines in der DDR seit 1967 eingesetzten Lebendimpfstoffes für Schweine (105). KRETZSCHMAR (105) beobachtete, daß eine Feldinfektion bereits 1 Monat nach der Immunisierung zu spezifischen Erkrankungen führt, die Virusvermehrung aber deutlich reduziert ist.

In Kombination mit hygienischen Maßnahmen wird in verseuchten Schweinebeständen besonders stark betroffener und gefährdeter Gebiete der DDR mit dieser Aujeszky-Lebendvakzine geimpft. Die Grundimmunisierung besteht aus 2 Impfungen im Abstand von 3-4 Wochen, revakziniert wird im 1. Jahr nach der Grundimmunisierung 3 mal im Abstand von 4 Monaten, im 2. Jahr 2 mal im Abstand von 6 Monaten. Nach der Grundimmunisierung wurden neutralisierende Antikörper mit Titern von maximal 1:16 beobachtet, die innerhalb von 4-6 Monaten unter die Grenze der Nachweisbarkeit absanken. In einigen Beständen wurde infolge scheinbarer Sanierung nach 1 1/2-jährigem Einsatz der Vakzine das Impfprogramm abgebrochen; diese Maßnahme hatte dort erneute Aujeszky-Ausbrüche zur Folge. In anderen Beständen traten bei konsequenter Impfung über 2 1/2 Jahre keine spezifischen Erkrankungen auf.

In der Tschechoslowakei versuchte ŠKODA (180) den Stamm Bukarest (BUK), durch Passagen in Hühnerembryofibroblastenkulturen (FHE) zu attenuieren. Nach 366 - 478 Passagen war das Virus für Rinder nach intramuskulärer und subkutaner Inokulation unschädlich. Aus diesem attenuierten Virus hergestellte Lebendimpfstoffe erzeug-

ten bei Mastrindern jedoch noch 10 % Impferkrankungen. Durch weitere Passagen des Stammes BUK in FHE-Kulturen versuchte ŽUFFA (214, 216), die Virulenz des Virus für empfängliche Tierspezies noch stärker abzuschwächen. In der 250. Kulturpassage besaß das Virus zwar keine Neurovirulenz mehr für Schweine, verminderte dagegen erst nach 400 Kulturpassagen seine Virulenz für Kälber und Schafe. Ein vollständiger Virulenzverlust des Aujeszkyvirus für Schafe und Rinder war jedoch auch durch weitere Passagen nicht zu erreichen. Derselbe attenuierte Stamm wurde unter Laborbedingungen an Saugferkeln, Absatzferkeln, Läufern und Sauen geprüft (182) und später erfolgreich in Feldversuchen an Schweinen eingesetzt (183).

Selbst nach 800 Passagen in FHE-Kulturen besaß der attenuierte Aujeszkyvirusstamm BUK für Schafe noch eine gewisse Virulenz (218). Unter Verwendung der Plaquetechnik differenzierten ŽUFFA und DLHY (218) Viruskclone, von denen sich 1 als avirulent erwies. Nach weiteren Passagen in FHE-Kulturen stellten sie aus dieser klonisierten Virusvariante einen Lebendimpfstoff her, der sich im Rahmen einer Notimpfung in einem Aujeszky-erkrankten Mastbullenbestand bei 220 Tieren gut bewährte. Es traten bei den Impfungen keine klinischen Erscheinungen auf, und Neuerkrankungen wurden nicht mehr beobachtet. Nach einer Revakzination im Abstand von 2 Wochen ließen sich in den geimpften Bullen neutralisierende Antikörper mit Titern bis 1:128 nachweisen.

SUHAKI u.M. (194) erhielten bereits nach 300 Passagen des Aujeszkyvirusstammes BUK in FHE-

Kulturen ein für Schafe sowie für Hunde und Katzen avirulentes und immunisierendes Impfvirus. Für das Schwein verlor das Impfvirus schon nach 250 Kulturpassagen seine Virulenz. Die Immunogenität des Virus wurde serologisch bei 8 vakzinieren Schweinen geprüft. Nach Revakzination bildeten die Impflinge virusneutralisierende Antikörper mit Titern bis 1:32.

Einen für Schafe avirulenten Stamm des Aujeszkyvirus isolierte ŽUFFA (217) über Plaque-Klonisierung. Dieser Klon BUK-TK-309/9,2 erwies sich nach intramuskulärer Verimpfung auf 8-10 Monate alte Schafe als unschädlich; es traten keinerlei klinische Erscheinungen auf, und Temperaturanstiege waren nicht zu beobachten. Bei Vakzination der Schafe mit hohen Dosen wurden neutralisierende Antikörper stimuliert, die Titer standen in direkter Abhängigkeit zur Impfdosis. Nach 2-maliger Vakzination mit $2 \times 10^{5,6}$ KID₅₀/ml Impfvirus kam es bei den geimpften Schafen zu einer belastbaren Immunität für die Dauer von 10 Monaten gegenüber einer Infektion mit 10^5 LD₅₀ des virulenten Aujeszkyvirusstammes.

Der Stamm BUK-TK-300/9,2 wurde von ŽUFFA u.M. (220) später an Nerzen getestet und erwies sich auch in dieser Spezies als unschädlich und immunogen.

2.2.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern

Aujeszkývirus zu inaktivieren ist relativ einfach, inaktiviertes Virus mit ausreichender Immunogenität zu erhalten, ist bis jetzt jedoch nur wenigen gelungen.

1937 versuchten MANNINGER und MARCIS (118) erfolglos, Aujeszkývirus (virushaltiges Organmaterial infizierter und gestorbener Kaninchen und Schafe) mit Formalin unter Erhalt der Immunogenität zu inaktivieren. Auch KOCH und ABRAHAM (99) hatten keinen Erfolg. BAZYLEV (7) und LJUBAŠENKO u.M. (109) gelang es jedoch, eine formalininaktivierte Adsorbatvakzine auf der Basis von in Hühnerembryonen vermehrtem Virus mit guter Immunogenität für Labortiere zu entwickeln. Auch ŽUFFA (215) erreichte mit formalininaktiviertem Aujeszkývirus eine gute Immunität in Meerschweinchen, Mäusen und Hühnern. Eine Immunisierung bei Schweinen konnte mit dieser Vakzine aber nicht erreicht werden. Auch in anderen Versuchsreihen (186, 199, 72) bestätigte sich immer wieder die Erfahrung, daß formalininaktiviertes Aujeszkývirus für eine Vakzinierung von Nutztieren, besonders von Schweinen, ungeeignet ist.

Ebenso unbefriedigende Ergebnisse brachte die Verwendung von Stickoxyd (83) und γ -Bestrahlung (49) als Inaktivierungsmittel sowie die Thermo-inaktivierung in Anwesenheit von $MgCl_2$ (219). Auch UV-inaktiviertes Virus, das nach BÉLADI und IVÁNOVICS (15) und DÍLOVSKY (48) kleine Versuchstiere gut immunisiert, löste nach ŽUFFA (215) in Schweinen keine Antikörperbildung aus.

HARALMBIEV u.M. (72) stellten eine Äthanol-inaktivierte Vakzine her. Hierzu wurde in FHE-Kulturen gezüchtetes Virus mit einem Gemisch aus Glycerin, absolutem Alkohol und flüssigem Paraffin 20 Stunden bei $+37^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die so gewonnene Vakzine erwies sich in Kaninchen als unschädlich. In Schafen wurden nach Verimpfung von 15 ml der Vakzine hohe Titer neutralisierender Antikörper nachgewiesen. Obwohl 8 Monate alte Kälber auf die Immunisierung serologisch nicht reagierten, waren sie gegenüber einer subkutanen Challenge-Infektion mit 10^5KID_{50} des vollvirulenten Aujeszkyvirus teilweise geschützt, nur 2 von 6 im Versuch stehenden Kälbern starben nach dem Challenge. Ausgewachsene Rinder entwickelten nach 2-maliger subkutaner Immunisierung mit 20 ml der Vakzine im Abstand von 2 Wochen hohe neutralisierende Antikörpertiter (Neutralisationsindices bis 825 000). Das Antikörperbildungsvermögen in Schweinen war nach 2-maliger Impfung vergleichsweise schlechter als in Schafen und Rindern. Auch hier wurde eine Altersabhängigkeit hinsichtlich der Immunantwort entsprechend den mit Rindern gemachten Erfahrungen beobachtet.

Die Äthanolvakzine von HARALMBIEV u.M. (72) ist in Bulgarien in größerem Maße eingesetzt worden. In 6 Schweinezucht- und -mastbetrieben, in denen vor der Impfung jährlich 60-250 Ferkel an der Aujeszky'schen Krankheit starben, wurden nach konsequentem Einsatz der Vakzine keine weiteren Erkrankungen mehr beobachtet.

In Dänemark entwickelten BORGEN und ESPENSEN (24) einen Impfstoff über Photoinaktivierung

von methylenblau-sensibilisiertem Aujeszky-virus. In Meerschweinchen und Kaninchen war der Impfstoff wirksam. Mit 50 ml der Vakzine subkutan 2 mal im Abstand von 3 Wochen vakziniierte Muttersauen bildeten neutralisierende Antikörper, die über das Kolostrum auf 2 Wochen nach der Vakzination geborene Ferkel übertragen wurden. Die Ferkel waren gegenüber einer intranasalen Belastungsinfektion immun. BORGES und ESPENSEN (24) halten eine photoinaktivierte Aujeszky-Vakzine zur Immunisierung von trächtigen Mutterschweinen in Gebieten mit sporadischem Auftreten von Pseudowut für geeignet.

BERBINSCHI (18) und BERBINSCHI u.M. (19, 20) inaktivierten Pseudowutvirus mit Saponin, LISSENKO u.M. (108) mit Kristallviolett und TSCHUMAKOV u.M. (201) mit Betapropiolakton. NEDJALKOV u.M. (141) prüften vergleichend die Immunogenität von saponin-, betapropiolakton- und kristallviolett-inaktiviertem Aujeszkyvirus, das nach 10 Passagen in Hühnerembryonen 56 mal in Hühnerembryofibroblastenkulturen passiert worden war. Als minimale Konzentration wurden für Saponin 0,3 %, für Betapropiolakton 0,03 % und für Kristallviolett 20 % ermittelt. Mit Kristallviolettvakzine geimpfte Schafe reagierten erst nach Revakzination immunologisch positiv, während es nach Verabreichung von betapropiolakton- bzw. saponin-inaktiviertem Virus bei den Schafen bereits nach einmaliger Impfung zu einem Anstieg der neutralisierenden Antikörper kam und gleichzeitig ein Schutz gegenüber einer intranasal durchgeführten Testinfektion auftrat. Für die

Prüfung der 3 Vakzinen in Schweinen wurden Gruppen von 6 Tieren mit 5 ml des jeweiligen Impfstoffes 2 mal im Abstand von 10 Tagen s.c. immunisiert. 30 Tage nach der Erstimmunisierung wurden je 3 Tiere intranasal und 3 intrazerebral infiziert. Die intranasale Testinfektion erwies sich als unbrauchbar, da die Kontrollen ebenso überlebten wie die immunisierten Tiere. Der intrazerebralen Belastung hielten jeweils 2 Tiere in jeder Gruppe stand. Bei den gestorbenen Schweinen waren im Gegensatz zu den überlebenden keine neutralisierenden Antikörper nach der Revakzination ausgebildet worden.

NEDJALKOV u.M. (142) prüften später eine kombinierte Kristallviolettvakzine gegen Schweinepest und Pseudowut bei Schafen. Die 2 mal im Abstand von 15 Tagen mit 10 ml der Kombinationsvakzine geimpften Schafe überlebten die Challenge-Infektion mit 5000 LD₅₀ des Aujeszkyvirus. Feldversuche wurden mit der Kristallviolettvakzine nicht durchgeführt.

Nach ŠKODA und WITTMANN (184) bleibt die Immunogenität des Pseudowutvirus durch Inaktivierung mit 2-Äthyläthylenimin (EEI) erhalten. Die Inaktivierung erfolgte nach der Methode von WITTMANN u.M. (209) bei einer EEI-Konzentration von 0,15 % während 16-stündiger Inkubation bei +37°C. Jeweils 5 Schweine wurden mit dem inaktivierten Virus ohne und mit Adjuvanszusatz immunisiert; als Adjuvans diente Diäthylaminoäthyl-Dextran (DEAE-D) bzw. inkomplettes Freundsches Adjuvans. Nach intratrachealer Testinfektion galt das Ausbleiben eines bei den nichtgeimpften Kontrolltieren beobachteten Temperaturan-

stieges als Parameter für die Belastbarkeit der Immunität. Da lediglich das inaktivierte Virus mit DEAE-D-Zusatz einen Immunschutz induzierte, bildete diese Vakzine die Grundlage für weitere Immunisierungsversuche, in denen der optimale Antigengehalt des Ausgangsmaterials, die optimale Applikationsart (i.m./s.c.) und die Wirkung einer Revakzination ermittelt wurden. Unterschiedliche Virustiter vor Inaktivierung sowie verschiedene Applikationsformen brachten weder serologisch noch hinsichtlich der Belastbarkeit der Immunität signifikante Unterschiede. Lediglich eine Revakzination verbesserte die Immunantwort. Nach intrazerebraler Challenge-Infektion (85-137 Tage p.vacc.) überlebten 24 von insgesamt 40 Schweinen; es wurde damit eine "Schutzquote" von 60 % erreicht. Es bestand jedoch keine Korrelation zwischen Antikörpertiter zum Zeitpunkt der Testinfektion und Belastbarkeit der Immunität. Das Ergebnis der Challenge-Infektion ist nach Auffassung der Autoren deshalb der einzige Gradmesser für die Beurteilung der Brauchbarkeit einer Aujeszky-Vakzine.

Derzeit werden in osteuropäischen Ländern und in der DDR neben Lebendvakzinen auch Impfstoffe aus äthanolinaktiviertem Aujeszkyvirus gegen die Pseudowut des Schweines mit Erfolg eingesetzt. Die Photoinaktivierung sowie die Inaktivierung mit Kristallviolett und EEI scheinen geeignete Methoden für die Herstellung einer Vakzine aus inaktiviertem Aujeszkyvirus zu sein, zur endgültigen Beurteilung fehlen allerdings noch größere Praxiserfahrungen.

2.3. Impfstoffe gegen die infektiöse bovine
Rhinotracheitis - infektiöse pustulöse
Vulvovaginitis

Die infektiöse bovine Rhinotracheitis (IBR), deren Erreger 1956 von MADIN u.M. (112) erstmals isoliert und als IBR-Virus bezeichnet wurde, hat in den 50-er Jahren in Amerika zu schweren wirtschaftlichen Verlusten geführt. Nachdem der Erreger der Erkrankung bekannt war, haben zahlreiche Forschergruppen, besonders in den USA, an der Entwicklung von Vakzinen gegen die IBR gearbeitet.

In Europa verursachte die infektiöse pustulöse Vulvovaginitis (IPV) bzw. infektiöse pustulöse Balanopostitis (IBP) - Bläschenausschlag des Rindes - große Schäden, besonders in Besamungsstationen. Der Erreger dieser Erkrankung wurde zunächst als selbständiges Virus mit Antigenverwandtschaft zum IBR-Virus angesehen (190); es stellte sich später jedoch heraus, daß das IBR-Virus verschiedene Manifestationsmöglichkeiten hat und unter anderem Erkrankungen des Genitale verursacht.

Heute werden die verschiedenen klinischen Verlaufsformen unter der Bezeichnung infektiöse Rhinotracheitis - infektiöse pustulöse Vulvovaginitis (IBR-IPV) zusammengefaßt, der gemeinsame Erreger wird als IBR-IPV-Virus bezeichnet.

In Amerika wurde die abgekürzte Bezeichnung IBR-Virus beibehalten, während das Virus in Europa im Zusammenhang mit Genitalerkrankungen oft IPV-Virus genannt wird.

2.3.1. Lebendimpfstoffe

Seit 1950 wird in den USA an der Entwicklung von Lebendvakzinen gegen die Rhinotracheitis des Rindes gearbeitet.

YORK (211), YORK u.M. (212, 213), SCHWARZ u.M. (170) und KENDRICK u.M. (93) attenuierten das Virus in Kälbernierenzellkulturen (ENK) und stellten dadurch einen Lebendimpfstoff her, der in breitem Umfang in den USA eingesetzt wurde. SCHWARZ u.M. (170) schwächten die Virulenz des Virus in 40 rasch aufeinanderfolgenden Passagen in ENK so weit ab, daß der attenuierte Stamm nach intramuskulärer Applikation in Kälbern lediglich eine kurzdauernde geringe Temperaturerhöhung hervorrief; das Impfvirus induzierte die Bildung neutralisierender Antikörper und führte zu einer belastbaren Immunität in den Impflingen.

BROWN u.M. (28) prüften 1959 zwei handelsübliche Lebendvakzinen aus in homologen Zellkulturen attenuiertem IBR-Virus (nähere Angaben über die Passagenzahl liegen nicht vor). In ersten Versuchen wurden die Vakzinen in jeweils 10 Rindern getestet. 4 Wochen nach intramuskulärer Applikation von 2 ml bestand eine belastbare Immunität: auf eine intratracheale Testinfektion mit Nasenspülproben spezifisch erkrankter Rinder reagierten lediglich einige Impflinge mit einer leichten Temperaturerhöhung. In daran anschließenden Feldversuchen wurden die gleichen Vakzinen an insgesamt 4326 Rindern in IBR-verseuchten Beständen getestet. In jedem Bestand wurden 50 % der Tiere mit 2 ml i.m. geimpft, die ungeimpften Rinder dienten als Bezugspunkt für die Reduktion

spezifischer Erkrankungen. In den endemisch verseuchten Beständen konnte der Prozentsatz der respiratorischen Erkrankungen von 5,6 % bei nichtgeimpften auf 1,08 % bei geimpften Rindern reduziert werden.

SCHWARZ u.M. (171) versuchten eine weitere Virulenzabschwächung des IBR-Virus durch Passagen in Schweinenierenzellkulturen zu erreichen. Nach 10 Zellkulturpassagen besaß das Impfvirus noch volle Virulenz für Rinder, nach der 60. Kulturpassage war seine Virulenz jedoch deutlich vermindert. Ein vollständiger Verlust der Virulenz für Rinder trat erst nach 100 Passagen in Schweinenierenzellkulturen ein. Die Attenuierung führte jedoch gleichzeitig zum Verlust der Immunogenität.

ZUSCHEK und CHOW (221) gelang es 1961, einen unschädlichen Lebendimpfstoff nach 80 Passagen des IBR-Virus in Kälbernieren- und darauffolgenden 22 Passagen in Hundenierenzellkulturen zu entwickeln. Nach intramuskulärer Applikation von 2 ml der Vakzine wurden keinerlei klinische Symptome bei den 10 geimpften Kälbern beobachtet.

14 Tage p.vacc. waren in den Impfungen neutralisierende Antikörper mit Titern bis 1:108 nachweisbar, eine zu diesem Zeitpunkt durchgeführte intratracheale Testinfektion überstanden die Kälber ohne klinische Symptome. Feldversuche wurden mit dieser Vakzine nicht durchgeführt.

In den USA gelang es, durch eine langjährige Impfkampagne mit einem Lebendimpfstoff auf der Basis eines in Kälbernierenzellkulturen attenuierten IBR-Virus die respiratorische Form der Erkrankung in geimpften Beständen weitestgehend zu verdrängen (23, 27, 38). Die Impfung erfolgte einmal jährlich in

einer Dosis von 2 ml. LUTZ u.M. (111) empfahlen, schon bei drei Wochen alten Kälbern mit der Immunisierung zu beginnen. Zu Beginn der 60-er Jahre wurden gehäuft Aborte nach der Vakzination beobachtet, zu dieser Zeit war jedoch nicht gesichert, daß das IBR-Virus Aborte verursacht. Noch bevor das Rhinotracheitisvirus in ursächlichen Zusammenhang mit natürlichen Verwerfensfällen gebracht wurde (133), machten ROBINSON u.M. (164) statistische Erhebungen über postvakzinale Abortfälle bei insgesamt 39 Herden in 6 Staaten der USA. Nach Vakzination von insgesamt 1549 trächtigen Kühen traten keine Aborte auf. 1968 bewiesen McFEELY u.M. (131) jedoch in einer geimpften Herde, daß für die bei 17 % von 118 trächtigen Kühen erfolgten Aborte ursächlich das Impfvirus verantwortlich zu machen war. In den folgenden Jahren berichteten auch andere Autoren von derartigen Impfschäden (90, 136), darüberhinaus beobachteten KELLING u.M. (90) Verwerfen bei nichtgeimpften trächtigen Kühen, die mit vakzinieren Rindern in Kontakt kamen. Ende der 60-er Jahre wurde in den USA daraufhin der Einsatz von handelsüblichen Lebendimpfstoffen auf Mastrinder beschränkt. 1971 gelang es TODD u.M. (197, 198) über Passagen in Kaninchennierenzellkulturen (Angaben über die Passagenzahl liegen nicht vor) einen IBR-Lebendimpfstoff zu entwickeln, der sich auch für trächtige Kühe als unschädlich erwies (87). Diese modifizierte Lebendvakzine wurde in einer Dosis von 1 ml Rindern aller Altersstufen - ohne Berücksichtigung des Trächtigkeitsstadiums - intranasal appliziert. Von 742 geimpften Rindern bildeten 98,6 % neutralisierende Antikörper; bei 2,5 % von 157 trächtigen Kühen traten postvakzinale Aborte auf, die jedoch nicht auf das Rhinotracheitisvirus zu-

rückzuführen waren.

KELLING u.M. (91, 92) prüften die gleiche Vakzine bei 3 - 9 Monate alten Kälbern vergleichend nach intramuskulärer und subkutaner Applikation. Von 32 subkutan geimpften Kälbern entwickelten 87,5 % neutralisierende Antikörper mit Titern bis $>1:16$, während nur bei 48 % von 22 intramuskulär geimpften Kälbern 4 Wochen p. vacc. Antikörper nachzuweisen waren. Eine intramuskuläre Revakzination im Abstand von 4 Wochen wirkte nur bei den i.m.-grundimmunisierten Tieren einheitlich als Booster.

Die von TODD u.M. (197) entwickelte Lebendvakzine ist in den USA handelsüblich und wird intranasal appliziert. Sie unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Immunogenität nicht signifikant von der intramuskulär zu applizierenden Vakzine (184, 168). Beide Arten von IBR-Lebendvakzinen sind in einer Reihe von Kombinationsimpfstoffen gegen Infektionen des Rindes enthalten (169).

Von ZYGRAICH u. M. (225) ist in jüngster Zeit die immunisierende Fähigkeit einer temperatursensiblen Mutante des bovinen Rhinotracheitisvirus überprüft worden. Diese als RLB 106 bezeichnete Mutante vermehrt sich in vitro bei einer Inkubationstemperatur von $+30^{\circ}\text{C}$ in gleicher Weise wie der Ausgangsstamm, bei $+38 - +39^{\circ}\text{C}$ sinkt der Titer der Mutante jedoch um $5 \log_{10} \text{ KID}_{50}/0,1 \text{ ml}$ ab. Insgesamt wurden 51 Kälber mit 4 ml des RLB 106-Stammes intranasal vakziniert. 4 Wochen p. vacc. traten neutralisierende Antikörper mit Titern bis 1:4 auf; die zu diesem Zeitpunkt durchgeführte Challenge-Infektion wirkte als Booster, die Titer stiegen auf Werte bis 1:16. Aus Nasentupferproben der Impflinge ließ sich 7 - 13

Tage p.vacc. das Impfvirus rückisolieren. Das ausgeschiedene Impfvirus erwies sich als genetisch stabil. Da diese temperatursensible Mutante des IBR-Virus offenbar einen guten Immunschutz auslöst, sich jedoch lediglich in der Nasenschleimhaut der Impflinge vermehrt (Angabe der Verfasser über nichtpublizierte Ergebnisse), dabei eine Interferonbildung induziert und genetisch stabil zu sein scheint, bietet sich dieses Virus für die Herstellung von Lebendimpfstoffen an. Feldversuche wurden noch nicht durchgeführt.

In Europa haben sich mit der Herstellung von Lebendimpfstoffen gegen den Bläschenauschlag und die Rhinotracheitis des Rindes vor allem STRAUB (190) und STRAUB u.M. (191, 192) beschäftigt. Sie entwickelten eine Vakzine auf der Basis eines in Kälbernierenzellkulturen attenuierten IBR-Virus. Mit dieser Vakzine sind inzwischen gute Erfahrungen gemacht worden.

Für Zuchttiere wird folgendes Impfprogramm vorgeschlagen: Im ersten Jahr zweimalige Impfung mit je 2 ml auf die Schleimhäute des Respirations- und Genitaltraktes, danach jährlich eine Auffrischungsimpfung. Für Masttiere ist die intramuskuläre Applikation geeigneter; es reicht eine Vakzination mit 5 ml einmal jährlich.

Das Impfvirus kann aus dem Genital- und Respirationstrakt bis 17 Tage p.vacc. rückisoliert werden. Nach der Revakzination entwickeln die Impflinge neutralisierende Antikörper mit Durchschnittstitern um $10^{1,37}$. 6 Wochen p.vacc. tritt eine belastbare Immunität auf. Neutralisierende Antikörper werden via Kolostrum auf die Nachkommen übertragen.

In einem enzootisch verseuchten Rinderbestand mit 240 - 280 Tieren machten STRAUB u.M. (192) mit ihrer Vakzine folgende Erfahrungen: Vor der Impfung wurde wiederholt bei mehreren älteren Kühen Bläschenauschlag diagnostiziert. Der Bestand war zudem charakterisiert durch einen hohen Besamungsindex und eine lange Zwischenkalbezeit. Jungtiere erkrankten an chronischen Katarrhen. Durch konsequente Impfung nach dem vorgeschlagenen Immunisierungsplan gelang es, im ersten Impfstadium den Besamungsindex von 2,1 auf 1,5 zu senken, die Zwischenkalbezeit verringerte sich von 414 auf 379 Tage, und die Milchleistung stieg von 4367 l auf 4993 l Stalldurchschnitt. In den nächsten Impfstadien wurden diese Werte weiter verbessert. Bei den Jungtieren waren bereits 2 Wochen p.vacc. die respiratorischen Erkrankungen abgeklungen. Bei keinem der trächtigen Rinder trat nach der Impfung Abort auf, auch jüngste Kälber zeigten keinerlei Krankheitserscheinungen nach der Vakzination.

2.3.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern

ZUSCHEK und CHOW (221) inaktivierten IBR-Virus mit 0,4 % Formalin und untersuchten die Immunität des inaktivierten Virus bei 10 Kälbern. Die Tiere bildeten neutralisierende Antikörper mit Durchschnittswerten von 1:14,5 und waren 14 Tage nach der Immunisierung gegenüber einer intratracheal durchgeführten Testinfektion immun. In den folgenden Jahren kam in den USA eine Vakzine aus inaktiviertem Rhinotracheitisvirus in den Handel, die von SHEFFY und RODMAN (173) an 6 Wochen alten Kälbern getestet wurde (genaue Angaben über die Inaktivierung sowie über das Immunisierungsschema liegen nicht vor). Nach Revakzination kam es zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern mit Titern bis 1:100. Auf eine intranasale Testinfektion reagierten die Impflinge mit einem Temperaturanstieg über 5 - 8 Tage, Fraßlust und gestörtem Allgemeinbefinden; klarer Nasenausfluß wurde über 5 Tage nach der Belastungsinfektion beobachtet.

Inaktiviertes IBR-Virus ist in den letzten Jahren bevorzugt als Komponente von Mehrfachimpfstoffen, die zur Bekämpfung von respiratorischen Erkrankungen des Rindes empfohlen wurden, verwendet worden (47, 101, 122, 166, 167, 169).

In Amerika entwickelten MATSUOKA u.M. (122) einen Kombinationsimpfstoff gegen die infektiöse Rhinotracheitis, die Parainfluenza-3 und die Pasteurellose des Rindes. Die IBR-Komponente ist formalin-inaktiviert (nähere Angaben über die Formalinkonzentration und -einwirkungsdauer liegen nicht vor). Die Vakzine ist in einem Vorversuch an insgesamt

71 Kälbern geprüft worden. Im Abstand von 3 Wochen wurden 10 ml des Impfstoffes zweimal intramuskulär appliziert. Impfkomplikationen traten nicht auf. 1 Monat nach der Reimmunisierung waren neutralisierende IBR-Antikörper mit Titern bis 1:7,1 in den Impfungen nachweisbar. Die Testinfektion mit virulentem IBR-Virus rief in den vakzinierten Tieren keinerlei Krankheitserscheinungen hervor. Bei 9 der geimpften Kälber konnte eine Persistenz der neutralisierenden IBR-Antikörper über 1 Jahr beobachtet werden.

Der oben aufgeführte Kombinationsimpfstoff wurde später in Feldversuchen von SAMPSON u.M. (167) überprüft. Mastrinder bildeten 3 - 4 Wochen nach der Vakzination neutralisierende Antikörper gegen das Rhinotracheitisvirus mit Titern bis 1:23. Von den 206 vakzinierten Tieren reagierten 8 mit vorübergehender Schwellung an der Injektionsstelle, klinische Symptome einer IBR-Infektion traten nicht auf.

KOLAR u.M. (101) bewiesen an trächtigen Kühen die Unschädlichkeit des formalininaktivierten IBR-Virus, das in einem handelsüblichen Kombinationsimpfstoff gegen die infektiöse bovine Rhinotracheitis, die bovine Virusdiarrhoe und Parainfluenza-3-Infektion des Rindes enthalten ist. In diese Versuche waren Kühe einbezogen, die sich im 3. bis 8. Trächtigkeitsmonat befanden; postvakzinale Aborte wurden nicht beobachtet, die zum errechneten Abkalbetermin geborenen Kälber waren gesund.

Von Immunisierungsversuchen an ungeborenen Kälbern berichteten KENDRICK und OSBURN (94). 7 Foeten wurden nach Laparatomie von Mutterkühen, die sich im 3. bis 8. Trächtigkeitsmonat befanden, mit 3 - 5 ml

eines formalinaktivierten IBR-Virus i.m. vakziniert und 30 - 60 Tage später durch Kaiserschnitt zur Welt gebracht. 6 Foeten hatten im Serum sowie in der Milz neutralisierende Antikörper jeweils mit Titern bis 1:11. Dieser Versuch beweist nach Meinung der Autoren die Unschädlichkeit der Vakzine.

Seit 1972 ist auch in Europa eine Kombinationsvakzine im Handel, die formalininaktiviertes IBR-IPV-Virus enthält. DAVIDSON und STONE (47) entwickelten eine sogenannte Virus-Pneumonie-Vakzine. Sie enthält 5 inaktivierte Virusarten: Parainfluenza-3-Virus, Adenovirus Typ 3, Reovirus Typ 1, IBR-IPV-Virus und den Erreger der bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal-disease. Folgendes Impfprogramm wurde vorgeschlagen: Die erste Impfung sollte im Alter von 6 - 8 Wochen erfolgen, die zweite 2 - 4 Wochen später und die dritte im Alter von 12 Wochen. Hierbei werden 2 ml der Vakzine intramuskulär appliziert. Eine jährliche Auffrischungsimpfung führt nach Meinung der Verfasser zu einem permanenten Impfschutz.

In Italien entwickelten ROSSI und BECCARIA (166) 1973 eine Kombinationsvakzine gegen die infektiöse bovine Rhinotracheitis, Parainfluenza-3 und die Pasteurellose des Rindes. Die Viruskomponenten wurden durch Hitze und Formalin inaktiviert. Eine zweimalige subkutane Impfung von 3 Monate alten Kälbern im Abstand von 15 Tagen führte zur Bildung spezifischer Antikörper und zu einer belastbaren Immunität.

In Ungarn wurde von MESZAROS (135) eine IBR-IPV-Vakzine aus inaktivierten Erregern in verseuchten Rinderbeständen eingesetzt. Als Inaktivie-

rungsmittel diente Formalin. In einem Bestand wurde nach Vakzination von 25 Kälbern keine spezifische Erkrankung bei den Impflingen beobachtet, während bei 40 nichtgeimpften Kontrolltieren die Morbiditätsrate keinen abnehmenden Trend zeigte. Bis auf eine geringe vorübergehende Temperaturerhöhung waren keinerlei Impfreaktionen zu beobachten. Auch bei 35 geimpften Bullen traten keine Impfkomplicationen auf. (Genaue Daten über Dosis und Applikationsform sowie ein genaues Immunisierungsschema liegen nicht vor). 5 Wochen nach der Impfung waren geringe neutralisierende Antikörper bis 1:5 in den geimpften Tieren nachweisbar. Der Verfasser betrachtete dies als ein "günstiges Ergebnis" und setzte daraufhin den gleichen Impfstoff in mehreren Landwirtschaftsbetrieben und Besamungsstationen in Ungarn ein. In den verseuchten Besamungsstationen verbesserte sich die Spermaqualität bei den geimpften Bullen. Als Impfprogramm schlug der Verfasser vor, in verseuchten Gebieten alle Tiere einmal jährlich zu impfen, Kälber sollten mit 1 - 4 Monaten die erste und im Alter von 5 - 9 Monaten die 2. Impfung erhalten.

2.4. Impfstoffe gegen die Mareksche Geflügel- lähmung

Diese zunächst als "Neurolymphomatosis gallinarum" bezeichnete Krankheit wurde 1907 von MAREK (120) beschrieben. Erst in den 60-er Jahren gelang die ätiologische Klärung, als unabhängig voneinander in England von CHURCHILL und BIGGS (40) und in den USA von SOLOMON u.M. (187) ein cytopathogenes Agens aus Organen spezifisch erkrankter Hühner isoliert wurde. 1968 wurde dieses Agens von NAZERIAN u.M. (140) und EPSTEIN u.M. (61) als Herpesvirus identifiziert.

Die Mareksche Geflügellähmung, die in Europa und Amerika weit verbreitet ist, hat mit zunehmender Intensivierung der Geflügelhaltung an Bedeutung gewonnen und stellt in Ländern mit ausgedehnter Hühnerzucht und -mast ein ernstes wirtschaftliches Problem dar. Als Bekämpfungsmaßnahme kam bis in die 60-er Jahre lediglich die stamping-out-Methode in Frage, gleichzeitig versuchte man mit geringem Erfolg, resistente Hühnerlinien zu züchten (71).

2.4.1. Lebendimpfstoffe

Noch bevor die Ätiologie der Marekschen Geflügel-lähmung geklärt war, wurden in den 30-er Jahren Versuche gemacht, eine Lebendvakzine gegen diese Erkrankung zu entwickeln.

SEAGER (172), FRITZSCHE (64) und HARTWIGK (73) verwendeten unfiltrierte und filtrierte Kotsuspensionen spezifisch erkrankter Hühner, die sie Küken und erwachsenen Hühnern subdural, intramuskulär oder per os verabreichten. Klinisch sowie pathologisch-anatomisch und -histologisch wurde bei den Impfungen nach der Vakzination die Mareksche Erkrankung diagnostiziert. FRITZSCHE (64) hielt daraufhin hygienische Maßnahmen für die einzige Bekämpfungsmöglichkeit der Marekschen Geflügellähmung.

Der erste Lebendimpfstoff wurde 1969 von CHURCHILL u.M. (41) entwickelt. Sie passierten den Stamm HPRS-16 in Hühnernierenzellkulturen und verimpften verschiedene Passagen intraperitoneal auf Küken. Bis zur 20. Zellkulturpassage führte das Impfvirus zu klinisch bzw. pathologisch-anatomisch feststellbaren spezifischen Erkrankungen; nach 33 und mehr Passagen traten keine spezifischen Todesfälle bei den geimpften Tieren auf. Die Immunogenität des Isolats HPRS-16 wurde an Eintagsküken und 21 Tage alten Küken getestet (42). Nach intraperitonealer Verimpfung des attenuierten Virus (31. - 39. Passage) kam es zur Bildung von präzipitierenden Antikörpern. Gegenüber einer intraperitonealen Challenge-Infektion erwiesen sich die geimpften Tiere als immun. 14 Tage p.vacc. wurde das Impfvirus aus dem Blut vakzinierter Tiere, die keiner Belastungsinfektion ausgesetzt worden waren, rückisoliert,

und an Hand der Präzipitationsreaktion wurde ermittelt, daß das attenuierte Impfvirus keine Rückwandlung erfahren hatte; als Parameter hierfür galt das Fehlen des A-Antigens, welches nur das virulente Ausgangsvirus besaß. BIGGS u.M. (22) schwächten das Isolat HPRS-16 durch 39 Passagen in Hühnernierenzellkulturen, einer Zwischenpassage in Hühnern und weiteren 6 bis 9 Zellkulturpassagen weiter in seiner Virulenz ab und verimpften das so attenuierte Virus auf insgesamt 6000 Eintagsküken sowie 3 Wochen alte Küken eines verseuchten Bestandes intraperitoneal. Der Immunisierungserfolg wurde mittels Reduktion der spezifischen Mortalität bei den Impfungen im Vergleich zu nicht geimpften Kontrolltieren bemessen. In 4 verschiedenen Impfversuchen konnte die spezifische Mortalität jeweils von 1,8/0,9/22,9 bzw. 5,7 % auf 0,2/0,0/4,5 bzw. 1,2 % reduziert werden. Obwohl in den ersten Versuchen durch die intraabdominale Applikation Todesfälle bei den vakzinieren Eintagsküken auftraten, hielten die Verfasser diese Impfmethode für die wirksamste. Sie wiesen darauf hin, daß die optimale Dosis und das optimale Impfalter in weiteren Versuchen getestet werden müßten.

RISPENS u.M. (161) entdeckten nach Kultivierung verschiedener Marek-disease-Virus-Isolate in Entenfibroblastenkulturen einen natürlich vorkommenden schwach virulenten Virusstamm CVI 988. Gegenüber einer Kontaktinfektion waren mit diesem Virusstamm geimpfte Eintagsküken geschützt, ein vollständiger Virulenzverlust des Virus wurde durch Passagen in Entenfibroblastenkulturen (DEF) erreicht (162). Der über 35 Passagen in DEF-Kulturen

attenuierte Marek-disease-Virusstamm CVI 988 wurde auch in Feldversuchen getestet (163); er führte in geimpften Eintagsküken verseuchter Bestände zu einer guten Immunität. Nichtgeimpfte Eintagsküken setzten sich mit dem von vakzinierten Tieren ausgeschiedenen Impfvirus auseinander und entwickelten ebenfalls eine belastbare Immunität.

Einen wesentlichen Fortschritt bei der Entwicklung von Lebendvakzinen gegen die Mareksche Geflügellähmung bedeutete die Isolierung eines apathogenen Putenherpesvirus, dessen antigene Verwandtschaft zum Marek-disease-Virus 1970 von WITTER u.M. (207, 208) nachgewiesen wurde. OKAZAKI u.M. (145) sowie PURCHASE u.M. (155) konnten mit diesem Putenherpesvirus (HVT) unter Labor- und Feldbedingungen in Hühnern eine Immunität gegenüber dem Marek-disease-Virus induzieren. Der als FC 126 bezeichnete Originalstamm wurde in Hühnernierenzellen und Entenfibroblastenzellkulturen passiert (207).

PURCHASE u.M. (156) verimpften diesen Virusstamm (11. und 25. Passage in DEF) vergleichend als zellgebundenes und zellfreies Virus auf hochempfindliche, eintägige Laborküken und auf normale Eintagsküken. Gleichzeitig wurde der Immunisierungserfolg nach intraabdominaler und subkutaner Applikation vergleichend geprüft. Nach Verimpfung von 1 - 5 plaquebildenden Einheiten (PBE) des Virus waren 50 % der Tiere gegen eine Kontaktinfektion geschützt. Die Autoren wiesen jedoch darauf hin, daß diese Dosis unter Feldbedingungen um ein Vielfaches erhöht werden muß, damit ein verlässlicher Schutz gegenüber der natürlichen Infektion gewähr-

leistet ist. Zwischen der 11. und 25. Passage des HVT bestand hinsichtlich der erzielten Schutzwirkung kein Unterschied, ebenso wenig ließen sich zwischen intraabdominaler oder subkutaner Applikation und Verwendung von zellgebundenem oder zellfreiem Virus Unterschiede beobachten. Für die Mareksche Geflügellähmung hochempfindliche Laborküken sowie normale Eintagsküken hielten dem 3 Wochen nach der Vakzination durchgeführten Challenge stand.

CHURCHILL u.M. (43) untersuchten den Einfluß einer prävakzinalen Immunität von Eintagsküken auf Virämie und Bildung neutralisierender Antikörper nach Vakzination mit dem Putenherpesvirus. Nach ihren Ergebnissen haben maternale Antikörper keinen Einfluß auf die Vermehrung des Impfvirus im Blut der vakzinierten Tiere. Es ist lediglich eine verzögerte und reduzierte Serokonversion bei Anwesenheit von maternalen homologen Antikörpern zu beobachten.

Lebendimpfstoffe auf der Basis von Putenherpesvirus sind inzwischen weltweit eingesetzt und bezüglich Wirksamkeit und Unschädlichkeit überprüft worden (107, 144, 154, 224).

Nach LANCASTER u.M. (107) wird die spezifische Mortalität in verseuchten Beständen von 8,6 % auf 1,1 % reduziert. Nach NORCROSS und RANKIN (144) kommt es zu einer Reduktion der spezifischen Mortalitätsrate um 85 %. Die Impflinge erweisen sich als immun. Ein Unterschied bezüglich Immunisierungserfolg nach intramuskulärer, subkutaner bzw. intraabdominaler Applikation scheint nicht zu bestehen.

Nach PURCHASE u.M. (157) wird die durchschnittliche Mortalität in geimpften Beständen von 19,2 auf 2,8 % reduziert und der Immunschutz dauert über 18 Monate. Die Legeleistung wird verbessert.

Von BENGELSDORFF und BERNHARDT (16) liegen Berichte über Impferfolge mit dem HVT gegen die Mareksche Krankheit in Europa vor. Die in Deutschland geforderte Minimaldosis beträgt pro Tier 1400 plaquebildende Einheiten. In Südeuropa konnte bei 177 500 statistisch erfaßten, geimpften Tieren eine Schutzrate von 1:5,1 belegt werden, während sie in Mitteleuropa bei 306 293 geimpften Tieren sogar 1:8,8 betrug. Die Schutzrate gibt das Verhältnis der spezifischen Mortalität bei geimpften Tieren und nichtgeimpften Kontrollen an.

Von einem signifikanten Rückgang der Mortalität in geimpften Broilerbeständen in Holland berichtet KILGORE(96). Durch die Impfung mit dem Putenherpesvirus wurde nicht nur die Mareksche Krankheit verdrängt, auch andere Geflügelkrankheiten traten in diesen Beständen seltener auf. Diese Ergebnisse haben HONEGGER u.M. (76) bestätigt. Bei einem Vergleich der Immunogenität von zellassoziertem und zellfreiem Putenherpesvirus kam KILGORE (97, 98) zu dem Ergebnis, daß das zellassozierte HVT in Eintagsküken zu einem besseren Immunschutz führt als das zellfreie, lyophilisierte Impfvirus. Dagegen erreichten SPENCER u.M. (189) nach Vakzination von 21 Tage alten Küken mit lyophilisiertem Impfstoff einen ebensoguten Immunschutz wie nach Vakzination mit zellassoziertem Putenherpesvirus. ZYGRAICH und HUYGELEN (222, 223) entdeckten weitere Putenherpesvirusstämme, die hinsichtlich ihrer immunisierenden Fähigkeiten dem FC 126-Stamm gleichen.

Nach intramuskulärer Verimpfung auf Eintagsküken induzierten diese HVT-Stämme neutralisierende Antikörper. Belastungsinfektionen wurden nicht durchgeführt.

2.4.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern

Im Jahr 1935 wurden erste Inaktivierungsversuche des zu dieser Zeit noch nicht klassifizierten Erregers durchgeführt. FRITZSCHE (65) verwendete hierfür Gehirn-, Nerven-, Rückenmark- und Eierstockmaterial spezifisch erkrankter Hennen, das er mit 0,1 % Formalin versetzte und nach Zerkleinerung und grober Filtrierung in einer Dosis von 0,2 ml subkutan auf insgesamt 250 5 Tage alte Küken verimpfte. Während der 7 Monate Beobachtungszeit erkrankten 1 geimpftes Küken und 2 von 800 ungeimpften Kontrolltieren an der Marekschen Geflügellähmung. Dieser Impfstoff war demzufolge avirulent, seine Immunogenität wurde jedoch nicht bewiesen.

Nach der Isolierung des Putenherpesvirus (HVT) prüften KAADEN u.M. (86) neben vermehrungsfähigem auch inaktiviertes Virus hinsichtlich seiner immunisierenden Eigenschaften bei Eintagsküken. Untersucht wurde die Immunogenität von gradientengereinigtem und sepharose-filtriertem HVT im Vergleich zu EEI-inaktiviertem (0,1 % EEI, 24 h, 37° C) und hitzeinaktiviertem (30 min 56° C) HVT. Gleichzeitig wurde die Immunogenität einer Membranfraktion, die sich von HVT-infizierten Hühnerembryofibroblastenkulturen (FHE) isolieren ließ, getestet. Jede Vakzine wurde zu gleichen Teilen mit komplettem Freundschens Adjuvans gemischt und in einer Dosis von 0,2 ml zweimal im Abstand von 14 Tagen i. m. appliziert. Die Challenge-Infektion mit dem virulenten Marek-disease-Virusstamm HPRS-16 erfolgte 8 Tage später. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Vakzine aus gereinigtem HVT	R* = 74 %
2. Vakzine aus hitzeinaktiviertem HVT	R = 0 %
3. Vakzine aus EEI-inaktiviertem HVT	R = 55 %
4. Vakzine aus Membranfraktionen HVT-infizierter FHE	R = 94 %

Nach diesen Untersuchungen scheint das für die Immunität gegen Marek-disease verantwortliche Antigen in der Virushülle lokalisiert zu sein. Durch Hitzebehandlung wurde das Virus zwar inaktiviert, gleichzeitig wurde dabei aber auch seine Immunogenität zerstört; daß der Verlust der Infektiosität nach Inaktivierung des HVT nicht zwangsläufig mit dem Verlust der Immunogenität einhergeht, bewiesen auch die Vakzinierungserfolge mit EEI-inaktiviertem Putenherpesvirus.

R* = Reduktion der spezifischen Mortalität

2.5. Impfstoffe gegen die infektiöse Laryngo-
tracheitis

Die infektiöse Laryngotracheitis des Geflügels wurde 1923 in den USA erstmals beschrieben (123). Später wurde die Erkrankung auch in Kanada, Australien, Japan und Europa beobachtet, hier traten jedoch keine vergleichbar ausgedehnten und schweren Enzootien wie in den USA auf. In den 30-er Jahren wurde das Virus aus natürlich erkrankten Tieren isoliert (8, 10).

Als Bekämpfungsmaßnahme bewährt sich in kleineren Betrieben die stamping-out-Methode, in größeren Geflügelhaltungen wird die Keulung mit hygienischen Maßnahmen und Notimpfungen kombiniert: erkrankte Tiere werden geschlachtet, gesunde Schutzgeimpft (165). Darüber hinaus wird in Gegenden, in denen die infektiöse Laryngotracheitis endemisch ist, prophylaktisch geimpft.

2.5.1. Lebendimpfstoffe

Nach HUDSON und BEAUDETTE (79) vermehrt sich das Virus der infektiösen Laryngotracheitis auch auf der Kloakenschleimhaut und führt dabei zu einer örtlichen Schleimhautentzündung. Auf Grund dieser Beobachtung im Jahre 1932 versuchten BEAUDETTE und HUDSON (13) Hühner lokal über die Kloake mit virulentem Virus zu immunisieren. Sie simulierten dabei das Prinzip der Variolation bei den Menschenpocken. Kloakal immunisierte Hühner überstanden eine 11 - 27 Tage später durchgeführte Testinfektion ohne klinische Erscheinungen, während umgekehrt bei Hühnern, die eine intratracheale Infektion überlebt hatten, nach kloakaler Testinfektion keine Reaktion auftrat. Die kloakale Vakzination mit dem virulenten Feldvirus war für die Prophylaxe der Erkrankung zwar erfolgreich (11, 13, 70), aber epizootisch gefährlich. Es wurden deshalb schon in den 30-er Jahren Versuche gemacht, das Virus der infektiösen Laryngotracheitis des Geflügels (ILT) zu attenuieren. Zunächst suchte man erfolglos nach einem empfänglichen heterologen Wirtssystem (9, 26).

1934 gelang es BURNET (34), das Virus auf der Chorioallantoismembran (CAM) von Hühnerembryonen zu vermehren, Attenuierungsversuche in Hühnereiern schlugen jedoch fehl (14, 25, 35); selbst nach 36 CAM-Passagen verlor das Virus für 5 - 6 Wochen alte Küken nicht an Virulenz (35). Dagegen gelang es URUSHADZE (203) durch 50 fortlaufende Passagen in Enteneiern ein avirulentes Impfvirus zu erhalten. In Parallelversuchen stellte er fest, daß bereits 9 Passagen ausreichten, das Virus zu attenuieren.

In den 50-er und 60-er Jahren wurden verschiedene natürlich vorkommende, schwach virulente Stämme des Virus der ILT isoliert (17, 37, 44, 121, 151, 152, 179), die nach GELENCZI u.M. (68) aber noch über so viel Restvirulenz verfügten, daß ihre Verwendung als Impfvirus ebenfalls bedenklich erschien. 1964/65 begannen GELENCZI u.M. (68, 69) mit Attenuierungsversuchen des ILT-Virus in Zellkulturen. Nach 150 Passagen in embryonalen Nieren- und Leberzellen von Hühnern und Puten erzeugte der attenuierte Virusstamm ASL L-6 nach Verimpfung auf die Chorioallantoismembran (CAM) atypische CAM-Läsionen; nach 51 bis 52 Passagen war das Virus für Küken bereits avirulent und führte zu einer belastbaren Immunität. Nach 10 rasch aufeinanderfolgenden Passagen in Küken sowie in Eiern zeigte das aus Impflingen reisolierte Virus auf der CAM das gleiche atypische Verhalten.

Versuche von CHURCHILL (39), durch Passagen in Zellkulturen und Chorioallantoismembranen embryonierter Enten- und Hühnereier ein schwach virulentes Impfvirus zu erhalten, schlugen fehl. Nach 6 Passagen in embryonalen Entennierenkulturen, darauffolgenden 3 Passagen auf der CAM embryonierter Enteneier und weiteren 2 Passagen auf der CAM embryonierter Hühnereier war der verwendete ILT-Virusstamm für Küken ebenso virulent wie das Ausgangsvirus.

KODA u.M. (100) versuchten, das ILT-Virus an heterologe Zellkultursysteme zu adaptieren. In primären Rinder-, Schweine- und Hundenierenzellkulturen sowie in einigen getesteten permanenten Zelllinien fand keine Virusvermehrung statt. In Hühnernierenzellkulturen durch 99 bis 124 Passagen attenuiertes ILT-Virus besaß eine geringe Virulenz für empfängliche Hühner und induzierte eine belastbare Immunität nach Verimpfung auf Küken.

Auf der Suche nach einer optimalen Applikationsform von ILT-Vakzinen wurde zunächst die kloakale Impfmethode variiert. BEACH u.M. (11) verglichen die Belastbarkeit der Immunität in Hühnern nach Auftropfen (Tropfmethode) bzw. Einreiben (Bürstenmethode) in die Kloake und nach intrabursaler Injektion. Die Bürstenmethode sowie die intrabursale Injektion brachten gleich gute Ergebnisse; derartig vakzinierte Küken waren noch 300 Tage p.vacc. gegenüber einer intratrachealen Challengeinfektion geschützt.

Die kloakale Impfung mittels Bürstenmethode bewährte sich in verschiedenen Immunisierungsversuchen zahlreicher Autoren (14, 25, 37, 39, 67, 68, 69, 74, 75, 85, 121, 151, 179) und ist bis heute die Vakzinationsmethode der Wahl (71, 165). HOWES u.M. (78) forderten für kloakal applizierte Vakzinen einen Virustiter von mindestens 10^6 EID₅₀/ml. Mit Vakzinen, die 10^4 EID₅₀/ml enthielten, erzielten die Autoren nur bei 50 % der Impflinge eine gute Immunität.

Auch RAGGI und LEE (160) wiesen auf die dosisabhängige Wirksamkeit von kloakal applizierten ILT-Vakzinen hin.

Grundsätzlich wird das Angehen der lokalen Impfreaktion am 3. bis 5. Tag p.vacc. kontrolliert, wobei eine ödematöse Schwellung der Kloakenschleimhaut mit einer lokalen katarrhalischen, hämorrhagischen oder fibrinösen Entzündung als positive Reaktion gewertet wird; negative Reagenten müssen nochmals vakziniert werden (71). Nach HITSCHNER und WHITE (74) sind alle geimpften Tiere eines Bestandes geschützt, wenn mindestens 50 % der Hühner positiv reagieren.

HITSCHNER und WINTERFIELD (75) schlagen eine Revakzination im Abstand von 6 Wochen mittels Augentropfmethode vor. In vergleichenden Untersuchungen mit einer nicht näher bezeichneten Vakzine hatte die kloakale Revaktination - gemessen an der Antikörperstimulation - keinen Erfolg, die Augentropfmethode jedoch wirkte als Booster und schützte die Impflinge gegenüber einer 16 Wochen p.vacc. durchgeführten Challengeinfektion.

RAGGI u.M. (158) prüften die Auswirkung einer intratracheal bzw. kloakal applizierten handelsüblichen ILT-Vakzine (genaue Angaben liegen nicht vor) auf die Legetätigkeit und den Futterkonsum von Legehennen. Hierbei führte die intratracheale Impfung zu einem Rückgang der Legetätigkeit, auch die reduzierte Futteraufnahme bei den Impflingen ließ die intratracheale Applikation als ungeeignet erscheinen. DARDIRI u.M. (46) sowie PULSFORD und WATTS (153) berichteten von postvakzinalen Todesfällen nach intratrachealer Applikation einer handelsüblichen ILT-Vakzine.

Zu widersprüchlichen Ergebnissen führte Aerosolisierung. Nach COVER und BENTON (44), BENTON u.M. (17) sowie CHURCHILL (39) kommt es nach Aerosolisierung zu Impferkrankungen und spezifischen Todesfällen (17), obwohl in den Versuchen natürlich vorkommende schwach virulente ILT-Virusstämme als Impfvirus verwendet worden waren. Dagegen berichteten MARKHAM u.M. (121) von der guten Verträglichkeit einer Aerosolvakzine für 2 Wochen alte Küken. Auch er verwendete einen schwach virulenten Feldstamm und stellte fest, daß noch ein Jahr p.vacc. in den geimpften Hühnern ein Immunschutz gegenüber einer Challengeinfektion bestand.

Die Federfollikelmethode wurde ebenfalls von verschiedenen Forschergruppen im Vergleich zu anderen Applikationsformen getestet (80, 81, 82, 137). Nach

MOLGARD und CAVETT (137) führte eine Federfollikel-Vakzination bei allen geimpften Tieren zu positiven Reaktionen, während vergleichsweise bei der kloakalen Applikation stets ein geringer Prozentsatz von Impflingen negativ blieb. Nach Bestreichen der Federfollikel sind Schwellung und Pustelbildung als positive Reaktionen zu werten (165).

In den 40-er Jahren wurden in den USA 20 000 bis 30 000 Hühner auf diese Weise mit guten Erfolgen immunisiert (137). Nach HUNT (81) hat die Federfollikelmethode folgende Vorteile: gute Verträglichkeit für Küken, sicheres Angehen der Impfung, leichte Ablesbarkeit der Impfreaktionen, keine Verstreuerung des Impfvirus über den Kot. Da die Immunität in den geimpften Tieren 3 Monate anhält, empfahl der Autor diese Impfmethode für Mastkükenbestände. In Neuseeland berichtete HUNGERFORD (80) von guten Impferfolgen nach Anwendung der Federfollikelmethode.

Bei Immunisierungsversuchen mit schwach virulenten ILT-Stämmen, die über das Trinkwasser verabreicht wurden, traten Impferkrankungen auf (121).

Von guten Immunisierungserfolgen nach konjunktivaler Applikation berichteten SHIBLEY u.M. (174, 175). Sie verwendeten hierfür den von COVER und BENTON (44) isolierten schwach virulenten ILT-Stamm 146, den sie in einer Dosis von 100 EID₅₀/ml auf die Conjunctiva gaben. 5 - 7 Tage p.vacc. kam es bei den geimpften Hühnern zu einer Lidschwellung, die bis zum 11. Tag anhielt. Eine 21 Tage p.vacc. über den Infraorbitalsinus durchgeführte Challengeinfektion mit 115 000 EID₅₀ des virulenten ILT-Virus überstanden die geimpften Tiere ohne Erkrankungen; neutralisierende Antikörper waren bis zu einem Jahr nach der Impfung nachweisbar.

Heute werden in endemisch verseuchten Gebieten der USA, Australiens, Kanadas und Neuseelands handelsübliche Vakzinen eingesetzt, die natürlich vorkommende schwach virulente oder über Gewebekulturen attenuierte ILT-Stämme enthalten. Als Applikationsmodus hat sich sowohl die kloakale Impfung in Kombination mit konjunktivaler Revakzination (71) als auch die Follikelmethode durchgesetzt (165).

GRATZL und KÖHLER (71) schlagen generell, ohne Bezug auf eine bestimmte Vakzine zu nehmen, folgendes Impfprogramm vor: Die erste Impfung sollte im Alter von 10 Wochen durch kloakale Applikation erfolgen. Da das Impfvirus während 7 - 9 Tagen über die Kloake ausgeschieden wird und in der Lage ist, empfängliche Tiere krank zu machen, muß das Angehen der Impfung am 4. bis 5. Tag p.vacc. kontrolliert werden; Küken, die keine Impfreaktion zeigen, sollten sofort neu geimpft werden. Durch eine konjunktivale Revakzination im Abstand von 2 Wochen kann die Dauer der Schutzwirkung wesentlich verlängert werden (75). 2 Wochen nach der Impfung besteht eine belastbare Immunität (46), die je nach Vakzine ein halbes bis ein Jahr anhält (71).

Als optimales Impfalter geben auch FURNESS (67) und HUNGERFORD (80) 10 Wochen an. Zu diesem Zeitpunkt sind in der Regel keine maternalen Antikörper mehr vorhanden, die eine aktive Immunisierung störend beeinflussen können. PULSFORD und WATTS (153) wiesen auf die Möglichkeit hin, auch schon 7 Tage alte Küken zu impfen, falls keine maternalen Antikörper vorhanden sind, d.h. wenn die Tiere aus ILT-freien Beständen kommen.

Nach PULSFORD (150) besteht bei Impfungen mit schwach virulenten oder avirulenten ILT-Stämmen die Gefahr, daß das Impfvirus im Impfling persistiert und somit Dauerausscheider entstehen (149, 152). Demgegenüber führt die Vakzination mit virulenten ILT-Stämmen zwar zu einer "sterilen Immunität", es treten jedoch bei der Verwendung solcher Vakzinen Impferkrankungen oder spezifische Todesfälle auf (85, 159).

2.5.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern

KERNOHAN (95), referiert durch BEAUDETTE (12), versuchte auf verschiedene Weise zu wirksamen ILT-Vakzinen auf der Basis von inaktiviertem Virus zu gelangen. Als Ausgangsmaterial diente in allen Versuchen eine 10 %ige Suspension von Trachealexsudat spezifisch erkrankter Hühner. Zunächst wurde das infektiöse Material während einer Stunde einer Temperatur von + 55° C ausgesetzt und dann mit 0,5 % Phenol behandelt. Ein weiterer Versuchsimpfstoff wurde durch Formalin-inaktivierung (5 % Formalin) der Trachealexsudatsuspension hergestellt, ein dritter durch Zusatz von Glycerin $\overline{aa}$ und 0,5 % Phenol, und schließlich wurde zur Herstellung einer vierten Vakzine das infektiöse Material über einen Zeitraum von 30 min. Chloroformdämpfen ausgesetzt. Nach subkutaner Applikation all dieser Vakzinen wurde kein Immunschutz erreicht.

Auch "chemisch inaktivierte" Organvakzinen auf der Basis von Lungen, Lebern, Milzen und Nieren spezifisch erkrankter und gestorbener Hühner besaßen keine Immunogenität (12). Von erfolgreichen Immunisierungsversuchen mit einem inaktivierten ILT-Stamm berichteten BABKIN u.M. (1). Der als Sprayvakzine eingesetzte Versuchsimpfstoff induzierte keine signifikanten Anstiege neutralisierender Antikörper; gegenüber einer intratrachealen Challengeinfektion mit 10^5 EID₅₀ eines virulenten Feldstammes am 100. Tag p.vacc. waren 71 bis 90 % der vakzinierten Hühner jedoch geschützt.

2.6. Impfstoffe gegen die feline Rhinotracheitis

Die feline Rhinotracheitis führt bei jungen Katzen zu Konjunktivitis, Tränenfluß, Schnupfen und Nasenfluß und in ihrer perakuten Verlaufsform bei Neugeborenen auch zu Todesfällen. Sie wurde erstmals 1957 in den USA beschrieben. In den folgenden Jahren wurden Fälle aus allen Staaten Amerikas, aus Kanada und auch aus einigen europäischen Ländern gemeldet. Besonders in Katzenzuchten und Tierheimen stellt die Erkrankung eine schwere Belastung dar.

2.6.1. Lebendimpfstoffe

Erste Versuche, eine Lebendvakzine gegen die Rhinotracheitis der Katze herzustellen, stammen von HORVATH u.M. (77).

1965 entwickelten FISHER und OTT (63) eine Vakzine gegen die "Chronische respiratorische Viruserkrankung der Katze". Grundlage war das Isolat 593 J, das aus erkrankten Katzen stammte und über 3 - 4 Passagen in Katzennierenkulturen gezüchtet worden war. Nach subkutaner Applikation von 2 ml der Vakzine stiegen die neutralisierenden Antikörper gegen das feline Herpesvirus von 1:4 vor der Infektion auf Werte bis 1:50 28 Tage p.vacc. an. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Challenge-Infektion mit dem virulenten Rhinotracheitisstamm C 27 durchgeführt. 13 Tiere erwiesen sich als immun, 2 entwickelten vorübergehend leichte klinische Symptome. Von 12 nicht-immunisierten Kontrolltieren erkrankten 10 schwer, 2 zeigten nur milde Krankheitserscheinungen.

Da wiederholt die Beobachtung gemacht worden war, daß die Infektion mit dem feline Rhinotracheitisvirus keine oder nur eine geringe Immunität hervorruft, prüften WALTEN und GILLESPIE (206) die Immunogenität des Rhinotracheitisvirus mittels experimenteller Infektion bei 12 Katzen. Sie konnten beweisen, daß eine Infektion mit dem Rhinotracheitisvirus der Katze in der Regel zu einer serologischen Reaktion führt; 21 Tage p.inf. ist die Immunität voll belastbar, nach 150 Tagen besteht noch ein partieller Schutz gegenüber einer Belastungsinfektion.

CRANDELL (45) versuchte, ein hochvirulentes Originalisolat (C 27) durch 100 fortlaufende Passagen in

Katzennierenkulturen zu attenuieren, ohne jedoch einen Verlust der Virulenz für die Katze feststellen zu können.

2.6.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern

Von NEIMANN und CRANDELL (143) wurde das Rhinotracheitisvirus nach BPL-Inaktivierung hinsichtlich seiner Immunogenität an Katzen getestet. Die Immunisierungsversuche schlugen fehl; nach intratrachealer Challenge-Infektion erkrankten die immunisierten Katzen spezifisch an Rhinotracheitis.

2.7. Impfstoffe gegen die Infektion mit caninem Herpesvirus

Das canine Herpesvirus wurde 1964 in Amerika erstmals aus neugeborenen Welpen isoliert, die an einer hämorrhagischen Diathese verendet waren. Nach CARMICHAEL (36) ist die Frequenz der bösartig verlaufenden Infektionen mit dem caninen Herpesvirus gering. Wir wissen aber heute, daß canine Herpesviren maßgeblich am sog. "Welpensterben" beteiligt sind.

Versuche, das canine Herpesvirus durch Serienpassagen in Hundenierenzellkulturen zu attenuieren, schlugen fehl. Nach Inaktivierung des Virus durch Formalin (Angaben über die verwendete Konzentration werden nicht gemacht) und Zugabe von $\text{Al}(\text{OH})_3$ waren wiederholte Applikationen von jeweils 5 ml notwendig, um in Welpen einen Antikörperanstieg zu erreichen.

Ein einsatzfähiger Impfstoff gegen die Infektion mit dem caninen Herpesvirus ist bis heute noch nicht entwickelt. CARMICHAEL (36) schlägt zur Bekämpfung der Erkrankung in endemisch verseuchten Hundezuchten vor: Immunisierung der Hündinnen vor der Belegung mit 2 oder 3 Dosen inaktiviertem caninen Herpesvirus mit einem verträglichen Adjuvans und passive Immunisierung der neugeborenen Welpen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Virusstämme

Als Virusausgangsmaterial für die Inaktivierungsversuche verwendeten wir folgende Rhinopneumonitisvirusstämme:

- a) Stamm C 6505, 13. Passage in primären Schweinenierenkulturen (ENS), Infektiositätstiter: $10^{4,75}$ KID₅₀/ml

Dieser Stamm wurde im Jahre 1966 in Deutschland aus einem abortierten Pferdefötus isoliert.

- b₁) Stamm RAC-H, 10. bis 15. Passage in primären und sekundären ENS-Kulturen, Infektiositätstiter: $10^{6,25}$ bis $10^{8,0}$ KID₅₀/ml in Abhängigkeit von der jeweiligen Passage.

- b₂) Stamm RAC-H, 267. bis 269. Passage in primären und sekundären ENS-Kulturen, Infektiositätstiter: $10^{7,25}$ KID₅₀/ml

Der Stamm RAC-H wurde 1964 in Polen über Goldhamster aus einem abortierten Pferdefötus isoliert. Der in der hohen Passagezahl verwendete Stamm stellt den durch fortlaufende Passagen in Primärkulturen aus Schweinenieren attenuierten Impfstamm dar.

3.1.2. Zellkulturen

Für Viruszüchtung und -titration sowie für Serumneutralisationstests wurden folgende Zellkultursysteme verwendet:

- a) ENS als Primär- und Sekundärkulturen aus Nieren von Schweinen.

Zur Anzucht verwendeten wir das folgende Medium:

70 % Earle

10 % Phenolrot

10 % Kälberserum

10 % Lactalbuminhydrolysat (5%ige Lösung)

Das Erhaltungsmedium enthielt die gleichen Bestandteile mit einem Kälberserumanteil von 5 %.

- b) Rabbit kidney (RK₁₃) = heteroploide Kaninchennierenzellkultur (BEALE et al.)

Diesen permanenten Zellstamm verwendeten wir in der 25. bis 60. Passage.

Das Anzuchtmedium setzte sich zusammen aus:

90 % TC 199 und

10 % Kälberserum

Als Erhaltungsmedium diente das gleiche Medium mit einem auf 5 % reduzierten Kälberserumanteil.

Aus technischen Gründen verwendeten wir in den Inaktivierungsversuchen Erhaltungsmedium mit reduziertem Proteinanteil oder ohne Proteine.

Die jeweiligen Zellen wurden in Rollerflaschen (100ml/ca. 1000 cm² Kulturfläche/ 12 U/Min.), Rouxschalen (100ml/ca. 240 cm² Kulturfläche), Vierkantflaschen (20ml/ca. 50 cm² Kulturfläche) sowie in Röhrchen (2ml/Stationärkulturen) und in Mikroplatten bei + 37°C gezüchtet.

Herstellung von Subkulturen:

In dichtbewachsene Rouxschalen wurden nach Abgießen des Anzuchtmediums 10-15 ml Saline-Trypsin-Versen (STV) in der folgenden Zusammensetzung gegeben:

10 % Saline A (10-fach)

5 % Trypsin (1,25%ig)

2,5 % Versen (1%ig)

82,5 % Aqua dest.

Es folgte Inkubation bei + 37°C für 3 - 5 Minuten bis zur Ablösung des Zellrasens von der Glaswand. Danach wurden die Zellen in Spitzröhrchen abzentrifugiert (5 Min./1000 U/Min.) und der Zellpellet in Anzuchtmedium suspendiert. Bei einer Teilungsrate von 1 : 0,5 für Rollerflaschen, 1 : 2 für Rouxschalen und Vierkantflaschen und 1 : 1 für Röhrchen erhielten wir nach 3 - 5 Tagen dichte Zellkulturen. Für die Herstellung von Schweinenieren-Sekundärkulturen in Mikroplatten wurde die Zellzahl auf 400.000 Zellen/ml eingestellt.

Im Vergleich zu den oben angeführten Zellkulturen prüften wir die folgenden Zellsysteme auf ihre Verwendbarkeit in den Versuchen:

a) Stabile Affennierenzellkulturen:

a₁) MS-LLC-MKII = monkey stable

Anzuchtmedium:

90 % Hank's-"Neu"

10 % Kälberserum

a₂) Vero = african green monkey kidney cell line

Anzuchtmedium:

80 % Hank's-Lösung

10 % Kälberserum

10 % Lactalbuminhydrolysat (5%ige Lösung)

6,4 ml NaHCO₃ (8,8%ig)/1000 ml

b) Hamsternierenzellkultur:

BHK₂₁-Clon 13 = baby hamster kidney

Anzuchtmedium:

90 % Hank's-"Neu"

10 % Kälberserum

Als Erhaltungsmedium für diese permanenten Zelllinien verwendeten wir das Leibowitz-Medium Nr. 15 (L₁₅).

3.1.3. Virusvermehrung

3.1.3.1. Einschritt-Vermehrung

Zur Ermittlung des optimalen Erntezeitpunktes des Saatvirus wurde die Einschritt-Vermehrung des Rhinopneumonitisstammes RAC-H auf sekundären ENS- und RK₁₃-Zellen beobachtet.

Eine dichtbewachsene Rouxschale wurde nach Abgießen des Anzuchtmediums zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen und 1 ml Virusmaterial (RAC-H 13. ENS-Passage) mit einem Infektiositätstiter von $10^{7,25}$ KID₅₀/ml während 2 Stunden bei Raumtemperatur adsorbiert. Das Animpfmaterial wurde dann durch dreimaliges Waschen wieder entfernt, die Rouxschale mit 60 ml Erhaltungsmedium aufgefüllt. In Parallelversuchen diente als Erhaltungsmedium für die ENS-Kulturen einmal proteinhaltiges Medium (5 % Kälberserum, 10 % Lactalbuminhydrolysat), zum anderen proteinfreies Medium (ohne Kälberserum und Lactalbuminhydrolysat); die Virusvermehrung in RK₁₃-Zellen wurde nur in Gegenwart von proteinhaltigem Medium (5 % Kälberserum) geprüft.

Proben wurden bei der Virusvermehrung in ENS-Kulturen 5, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach abgeschlossener Adsorption entnommen, bei der Vermehrung in RK₁₃-Zellen zunächst in 2-stündigem Abstand (bis 12 Stunden), dann ebenfalls in Intervallen von 24 Stunden bis Tag 4 p.i.

3.1.3.2. Züchtung und Gewinnung des Saatvirus

Zur Beimpfung der Zellkulturen wurde das Anzuchtmedium abgegossen, die Kulturen wurden zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen und mit dem Erhaltungsmedium beschickt. Zur Züchtung des in den Inaktivierungsversuchen verwendeten Virus (Testvirus) wurde zunächst im Proteinanteil reduziertes, später proteinfreies Medium eingesetzt. Dieser Maßnahme lag die Überlegung zugrunde, daß die eingesetzten chemischen Inaktivierungsmittel ihren Angriffspunkt nicht nur an Virusproteinen, sondern an allen ihnen zur Verfügung stehenden Aminosäuregruppen haben. Medium mit reduziertem Proteinanteil verwendeten wir nur bei der Viruszüchtung in RK₁₃-Zellen; es bestand aus 95 % TC 199 + 5 % Lactalbuminhydrolysat (5%ige Lösung) bzw. aus 99,5 % TC 199 + 0,5 % Kälberserum. Das proteinfreie Medium für die Viruszüchtung in ENS- und RK₁₃-Zellkulturen bestand aus Earle'scher Lösung bzw. TC 199 ohne Zusatz von Kälberserum und Lactalbumin. Rollerflaschen wurden mit 3 - 5 ml Virus, Rouxschalen mit 1 - 3 ml Virus mit einem Infektiositätstiter von $10^{4,75}$ - $10^{8,0}$ KID₅₀/ml - in Abhängigkeit von dem jeweils verwendeten Virusstamm und der Passagezahl - in 80 ml Medium beimpft. Nach der Beimpfung wurden die Gewebekulturen bei + 37°C bebrütet. Das Auftreten des cytopathischen Effektes (cpE) in den infizierten Zellkulturen wurde täglich kontrolliert; das Virus wurde bei 100%iger virusspezifischer Zerstörung des Zellrasens, die in Abhängigkeit vom verwendeten Virusstamm und der Passagezahl nach 24 - 72 Stunden erreicht war, geerntet. Dieser Erntezeitpunkt erwies sich an Hand der Titrationsergebnisse bei der Einschritt-Vermehrung als optimal.

Zur Zellaufschließung bedienten wir uns des Gefrier-
tauens. Wegen der Thermolabilität des Rhinopneumoni-
tisvirus folgte bereits nach einmaligem Gefriertauen
(- 80°C) die Gewinnung zellfreien Virusmaterials
durch Zentrifugation. Der Zelldetritus wurde bei
+ 4°C abzentrifugiert (25 Min./3000 U/Min.) und
der zellfreie Überstand gewonnen.

Um ein möglichst hochtitriges Virusmaterial für die
Inaktivierungs- und späteren Immunisierungsversuche
zu erhalten, konzentrierten wir diese Virusernten
durch Ultrazentrifugation (180 Min./ 30000 U/Min./
Lauftemperatur: + 4°C). (Gerät: Beckman/Spinco,
Mod. L2 Rotortyp: 42)

Das Viruspellet wurde in 1/10 des Überstandes
suspendiert und abgefüllt in Portionen von 5 - 10 ml
bei - 80°C gelagert.

Zur Prüfung der Eignung verschiedener Medien für die
Gewinnung des Saatvirus über Gefriertauen und für
die Lagerung bei - 80°C untersuchten wir den Infektio-
sitätsverlust nach Tiefgefrieren in Rinderamnio-
flüssigkeit (RAF) und Earle'scher Lösung.

In einem Parallelversuch wurden hierfür vier Roux-
schalen (sekundäre ENS-Zellkulturen) einheitlich
mit 1 ml Rhinopneumonitisvirus, Stamm RAC-H, 13. Passa-
ge mit einem Infektiositätstiter von $10^{7,0} \text{KID}_{50}/\text{ml}$
infiziert. Je zwei Rouxschalen erhielten Earle'sche
Lösung bzw. RAF als Erhaltungsmedium. Nach 100%iger
virusspezifischer Zerstörung der Zellkulturen wurde
das Virus jeweils mit und ohne Gefriertauen geerntet
und in Schweinenieren-Zellkulturröhrchen nach 24-
stündiger Lagerung bei + 4°C oder - 80°C titriert.

Erhaltungs- medium	Art der Virusernte	Titration nach Lagerung bei
Earle'sche Lösung	sofort 25' 3000 UpM	+ 4°C - 80°C
	- 80°C, danach 25' 3000 UpM	+ 4°C - 80°C
RAF	sofort 25' 3000 UpM	+ 4°C - 80°C
	- 80°C, danach 25' 3000 UpM	+ 4°C - 80°C

Tabelle 1: Übersicht über die Versuchsanordnung bei der Gewinnung und Lagerung von Rhinopneumonitis-virus, Stamm RAC-H, 14. ENS-Passage unter Verwendung von Earle bzw. RAF als Erhaltungsmedium

3.1.3.3. Virustitration

Die Virussuspensionen wurden in 10er Potenzen mit dem jeweiligen Erhaltungsmedium verdünnt, pro Verdünnungsstufe wurden 4 Gewebekulturröhrchen mit 2 ml der Virusverdünnung beimpft und anschließend bei + 37°C bebrütet. Die Ablesung des cytopathischen Effektes erfolgte täglich über einen Zeitraum von 7 Tagen, wobei jede Kultur mit virusspezifischen cytopathischen Veränderungen als positiv galt. Der Infektiositätstiter (KID_{50}/ml) wurde nach der Methode von SPEARMAN-KÄRBER (188) berechnet. Die Spezifität des cpE wurde stichprobenweise abgesichert.

3.1.4. Virusinaktivierung

3.1.4.1. Thermoinaktivierung

Die in den Thermoinaktivierungsversuchen verwendeten Abfülltechniken, die Inkubationstemperaturen und -zeiten bei Inaktivierung von Rhinopneumonitisvirus in proteinhaltigem, im Proteinanteil reduziertem und proteinfreiem Medium sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Unverdünnte Virussuspension wurde in Dialyseschläuchen (20 mm ϕ) = Versuch I - oder in Glasröhrchen (15 mm ϕ) = Versuch II - abgefüllt, in ein Wasserbad mit $+99^{\circ}\text{C}$ verbracht und am Ende der jeweiligen Inaktivierungszeit bei $+4^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Im Versuch III wurde die Rhinopneumonitisvirussuspension mit Hilfe einer Rotationspumpe (Guldener Vario Perpex II) und eines Silikonschlauches (2 mm ϕ) durch ein auf $+95^{\circ}\text{C}$ erhitztes Wasserbad geleitet. Der anschließende Schlauchteil wurde in ein Eisbad ($+1$ - $+3^{\circ}\text{C}$) gelegt, so daß das Virus im Anschluß an die Inaktivierung während etwa 1 Minute Durchlaufzeit abgekühlt und damit der Inaktivierungsprozeß unterbrochen wurde. Die Inaktivierungszeiten wurden bei konstanter Durchflußgeschwindigkeit durch die Länge des sich im Wasserbad befindenden Schlauches bestimmt.

Virus abgefüllt in	Temperatur des Wasser- bades	Inaktivie- rungszeit	Erhaltungs- medium	Versuch Nr.
Dialyse- schläuchen	+99°C	5; 3; 1,5 Min.	Earle protein- haltig	I
Glas- röhrchen	+99°C	1,5 u. 1 Min., 45; 30; 15 Sek.	Earle protein- haltig	II
Silikon- schläuchen	+95°C	20;15 Sek.	Earle protein- haltig	III
		20; 15; 10 Sek.	TC 199 im Protein- anteil re- duziert	
		13 Sek.	TC 199 protein- frei	

Tabelle 2: Übersicht über die durchgeführten Thermo-
inaktivierungsversuche

3.1.4.2. Inaktivierung mit Betapropiolakton (BPL)

Als Stammlösung verwendeten wir das von der Firma Schuchardt, München, hergestellte Hydracrylsäure- β -lacton mit einem Molekulargewicht von 72,06. Die 100%ige Stammlösung wurde bei - 20°C gelagert. Die Gebrauchsverdünnung des BPL wurde im Eisbad durch Verdünnung mit Aqua dest. unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und mit der Virussuspension gemischt.

Endkonzentration, Inkubationstemperatur und Inkubationszeit bei Verwendung von proteinhaltigem, im Proteinanteil reduziertem und proteinfreiem ErhaltungsmEDIUM in den einzelnen Versuchen sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt. Vor und nach der Inkubation wurde der pH des Gemisches mittels eines pH-Meters kontrolliert und mit einer 1-molaren Na_2HPO_4 -Lösung auf 7,2 eingestellt. Anschließend wurde das Versuchsgemisch bei $+ 4^\circ\text{C}$ gelagert, um das BPL zum vollständigen Zerfall in β -Hydroxypropionsäure und β -Chlorpropionsäure zu bringen. Bei Nicht-Einhalten der Lagerungszeit bei $+ 4^\circ\text{C}$ erwiesen sich die Versuchsgemische bei der Überprüfung des Infektiositätsverlustes in der Zellkultur als toxisch. In späteren Versuchen wurde das BPL durch 1-stündiges Dialysieren gegen phosphatgepufferte Kochsalzlösung bei $+ 4^\circ\text{C}$ aus dem Versuchsmaterial entfernt.

BPL Endkonzentra- tion (%)	Inkuba- tionstempe- ratur	Inkubations- zeit	Lagerung bei +4°C (h)	Erhal- tungs- medium
0,0003	Raumtempe- ratur	144 Std.	15	Earle protein- haltig bzw. TC 199 protein- haltig
0,0003 und 0,05	+ 4°C	144 Std.		
0,053		120 Std.		
0,3 und 0,2	+ 37°C	10 Std.		
0,15 und 0,10	+ 37°C	10 Std.	15	TC 199 protein- arm
0,15	+ 37°C	10; 8; 6; 4 Std. 2; 1,5, 1,0 Std. 45; 30; 15; 10; 5 Min.	25	Earle protein- frei
		2; 1,5; 1,0 Std. 45; 30; 15; 10; 5 Min.	s.Fuß- note *)	

*) anstelle von Lagerung bei + 4°C: Dialyse 1 Std. + 4°C

Tabelle 3: Übersicht über die durchgeführten Inakti-
vierungsversuche mit BPL

3.1.4.3. Inaktivierung mit Acetyläthylenimin (AEI)

Als Ausgangsmaterial wurde eine 80%ige AEI-Stamm-lösung (Firma Wellcome, Großburgwedel) verwendet, die bei -20°C gelagert wurde. Die 2%ige Gebrauchs-verdünnung wurde im Eisbad unmittelbar vor Gebrauch hergestellt, wobei phenolrothaltiges Earle als Verdünnungsmittel diente, um die Einstellung des Neutralpunktes mit einer n-NaOH anhand des Farb-umschlages vornehmen zu können. Erreichte Endkonzentration und Inkubationszeit bei Verwendung von protein-haltigem, im Proteinanteil reduziertem und protein-freiem Erhaltungsmedium in den einzelnen Versuchen sind aus der Tabelle 4 zu entnehmen. Der Inaktivie-rungsprozeß wurde nach 10- bis 16-stündiger Inkuba-tion bei $+37^{\circ}\text{C}$ durch Zugabe von 1 Teil Na-thiosulfat zu 9 Teilen Versuchsgemisch beendet; das Versuchs-material wurde im Anschluß daran bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Bei allen Versuchen mit chemischen Inaktivierungs-mitteln wurden unbehandelte Virusgemische als Temperaturkontrollen parallel angesetzt.

AEI Endkonzentration (%)	Inkubationszeit bei + 37°C (h)	Erhaltungs- medium
0,75; 0,5; 0,2; 0,15; 0,1; 0,09; 0,08; 0,07; 0,066; 0,05	16	Earle proteinhaltig
0,066; 0,04; 0,03; 0,02; 0,01	16	Earle bzw. TC 199 proteinarm
0,03	16, 14, 12, 10, 5, 2, 1	Earle proteinfrei

Tabelle 4: Übersicht über die durchgeführten
Inaktivierungsversuche mit AEI

3.1.4.4. Überprüfung des Inaktivierungserfolges in der Zellkultur

Zum Nachweis des Inaktivierungserfolges wurden 2 ml des jeweiligen Versuchsgemisches auf eine Vierkantflasche (ENS oder RK₁₃) geimpft und diese während 10 Tagen täglich auf cytopathischen Effekt (cpE) kontrolliert. Bei ausbleibendem cpE wurden nach Gefriertauen der infizierten Kulturen zwei Subpassagen auf Röhrchenzellkulturen durchgeführt. Von fraglich veränderten Kulturen wurden Zelloidinpräparate (130) angefertigt und nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf

virusspezifische Veränderungen, insbesondere Kern-einschlüsse, untersucht.

Das Ausbleiben von cpE in Anzucht und Subpassagen sowie in angefertigten Zelloidinpräparaten galt als Beweis für die vollständige Inaktivierung des Rhinopneumonitisvirus.

3.1.5. Immunisierung

3.1.5.1. Versuchstiere

Zur Prüfung der Immunogenität des inaktivierten Rhinopneumonitisvirus immunisierten wir erwachsene weibliche syrische Goldhamster. Die Hamster wurden mit inaktiviertem Virus mit und ohne Adjuvans-Zusatz immunisiert und über Untersuchung von Einzelblutproben in Komplementbindungsreaktion (KBR) und Serumneutralisationstest (SNT) die Antikörperbildung verfolgt.

Als zweites System verwendeten wir erwachsene Meerschweinchen. In diesem Versuch prüften wir lediglich die Immunogenität von aktivem Rhinopneumonitisvirus mit und ohne Adjuvanszusatz und AEI-inaktiviertem Virus.

3.1.5.2. Immunisierungsplan

Die Daten zu den Immunisierungsversuchen sind aus den Tabellen 5 und 6 zu entnehmen.

Gruppe	Tierzahl	Test-virus	Titer (log(KID ₅₀ /ml))	Inaktivierungsverfahren I.-mittel Endkonz. I.-temp. I.-zeit	Grundimmunisierung 1. Injektion	2. Injektion	2. = Tage nach 1.	Reimmunisierung	Reimm. = Tage nach 1.
A	8			BPL 0,70 % +37°C 10 Std.					
B	8	RAC-H 10. ENS, 7. RK 15	7,25	AEI 0,04 % +37°C 16 Std.	1 ml sc.			1 ml sc.	27
C	8			Hitze +95°C 15 Sek.					
D	9				0,25 ml sc. + 0,25 ml ic.	0,25 ml sc. + 0,25 ml ic.		0,50 ml sc. + 0,50 ml ip.	
E	8			BPL 0,15 % +37°C 10 Std.	0,50 ml sc. + 0,50 ml ic. (Virus + Adjuvans 1)	0,50 ml sc. + 0,50 ml ic. (Virus + Adjuvans 1)	26	0,50 ml sc. (Virus + Adj. 2) + 0,50 ml ip. (Virus ohne Adj.)	50
F	7	RAC-H 11. ENS	7,00		0,25 ml sc. + 0,25 ml ic.	0,25 ml sc. + 0,25 ml ic.		0,50 ml sc. + 0,50 ml ip.	
G	9			AEI 0,03 % +37°C 16 Std.	0,50 ml sc. + 0,50 ml ic. (Virus + Adjuvans 1)	0,50 ml sc. + 0,50 ml ic. (Virus + Adjuvans 1)		0,50 ml sc. (Virus + Adj. 2) + 0,50 ml ip. (Virus ohne Adj.)	
H	10	RAC-H 269. ENS	7,25		0,25 ml sc. + 0,25 ml ic.	0,25 ml sc. + 0,25 ml ic.		0,50 ml sc. + 0,50 ml ip.	
Kontroll- gruppe I	10	RAC-H 11. ENS	7,00	nicht inaktiviertes, vermehrungsfähiges Virus	0,25 ml sc. + 0,25 ml ic.	0,25 ml sc. + 0,25 ml ic.	26	0,50 ml sc. + 0,50 ml ip.	50
K	10				0,55 ml ic. (Virus + Adj. 3)	0,20 ml ip. + 0,30 ml ic. (Virus + Adjuvans 3)		0,50 ml ip.	
L	10			BPL 0,15 % +37°C 2 Std.	0,55 ml ic. (Virus + Adj. 4)	0,20 ml ip. + 0,30 ml ic. (Virus + Adjuvans 4)		0,50 ml ip.	
M	9				0,55 ml ic. (Virus + Medium)	0,20 ml ip. + 0,30 ml ic. (Virus + Medium)	16	0,50 ml ip.	57
N	10	RAC-H 14. ENS	7,75		0,55 ml ic. (Virus + Adj. 3)	0,20 ml ip. + 0,30 ml ic. (Virus + Adjuvans 3)		0,50 ml ip.	
O	10				0,55 ml ic. (Virus + Adj. 4)	0,20 ml ip. + 0,30 ml ic. (Virus + Adjuvans 4)		0,50 ml ip.	
P	10			AEI 0,03 % +37°C 16 Std.	0,55 ml ic. (Virus + Medium)	0,20 ml ip. + 0,30 ml ic. (Virus + Medium)		0,50 ml ip.	

TABELLE 5 : IMMUNISIERUNGSSCHEMA (HAMSTER)

Gruppe	Tier- zahl	Test- virus	Titer $\{-\log(KID_{50})/ml\}$	Inaktivierungsverfahren		Inaktivierungszeit		Grundimmunisierung	Reimmunisierung
A	3			I.-mittel	Endkonz.	I.-temp	I.-zeit	0,50 ml ip. + 0,50 ml sc. 16 Tage nach der 3. Injektion der Grundimmunisierung	
				AEI	0,05 %	+37°C	16 Std.		
B	3	RAC-H 10. ENS, 2. RK 75	6,00	nicht inaktiviertes, vermehrungsfähiges Virus				0,75 ml ip. + 0,75 ml sc. (Virus + Adj.-1) 3x im Abstand von 7 bzw. 18 Tagen zur 1. Injektion	0,75 ml ip. + 0,75 ml sc. (Virus + Adj.-1) 16 Tage nach der 3. Injektion der Grundimmunisierung
								0,50 ml ip. + 0,50 ml sc. 3x im Abstand von 7 bzw. 18 Tagen zur 1. Injektion	0,50 ml ip. + 0,50 ml sc. 16 Tage nach der 3. Injektion der Grundimmunisierung

TABELLE 6 : IMMUNISIERUNGSSCHEMA (MEERSCHWEINCHEN)

Zu Tabellen 5 und 6 :

ic. : intracutan auf 3 - 5 Stellen verteilt
sc. : subcutan

ip. : intraperitoneal
Adj. : Adjuvans

I.-mittel : Inaktivierungsmittel
I.-temp. : Inaktivierungstemperatur
I.-zeit : Inaktivierungszeit
Endkonz. : Endkonzentration

Adjuvans 1 : Hefezellen (s. Anmerkung)

Adjuvans 2 : komplettes Freundsches Adjuvans

Adjuvans 3 : Aluminiumhydroxid (Alhydrogel, 2 % Al₂O₃, Superfos Export Company)
versetzt mit Saponin (Saponin, rein weiß, Stammlösung: 1,25 %ig in Aqua dest.)

Adjuvans 4 : Mineralöl - Adjuvans (Philips - Duphar , Weesp)

Virus + Adjuvans aa
1 Std. bei +4°C geschüttelt

Virus + 25 % Al(OH)₃ + 0,0125 % Saponin

Anmerkung zu den Tabellen 5 und 6:

Das Hefeadjuvans enthielt *Saccharomyces-boulardii*-Zellen und wurde folgendermaßen hergestellt:
Nach Zentrifugation des gelagerten Materials wurden die Zellen in Aqua dest. auf 5×10^9 Zellen/ml verdünnt. Danach wurde die Suspension 4mal während 5 Minuten im Eisbad ultrabeschallt (Gerät: Branson sonic power, Modell S75). Nach Lyophilisation wurde das so gewonnene Material bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ gelagert und jeweils unmittelbar vor dem Gebrauch in Earle'scher Lösung mit einem pH von 7,4 1 : 10 (V/V) aufgenommen. In dieser Gebrauchsverdünnung entsprach dann der Anteil aufgeschlossener Hefezellen einer Konzentration von 5×10^8 Zellen/ml.

3.1.5.3. Blutentnahmen und Serumgewinnung

Der Zeitpunkt der Blutentnahmen in den mit Hamstern durchgeführten Versuchen ist aus der Tabelle 7 ersichtlich. Um das Risiko zu großer Versuchstierverluste während der wiederholten Blutentnahmen zu vermeiden, wählten wir in den Gruppen K - P bei der 3. und 4. Entnahme nur einzelne Tiere aufgrund der Ergebnisse der Neutralisationstests vorausgegangener Blutentnahmen aus.

Die Blutentnahmen bei den Meerschweinchen wurden jeweils vor jeder Injektion und 14 Tage nach der Reimmunisierung vorgenommen. Vor den Immunisierungsversuchen wurden zur Kontrolle sogenannte Nullseren entnommen.

Zur Blutentnahme wurden die Versuchstiere mit einem Äther-Chloroform-Gemisch narkotisiert. Die Entnahme erfolgte über Herzpunktion; pro Tier wurde bei jeder Entnahme ca. 1 ml Blut abgenommen. Die so gewonnenen Einzelblutproben wurden in Kahn-Röhrchen (ϕ 6 - 8 mm) aufbewahrt und während des Gerinnungsprozesses zunächst 2 Stunden bei $+ 37^{\circ}\text{C}$, dann über Nacht bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach Lösen des Koagulums von der Glaswand wurden die Blute bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert (25 Min./1800 U/Min.) und der Serumüberstand mit Blutzuckerpipetten abpipetiert. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben) wurde die Menge der einzelnen Seren während des Abpipetierens festgestellt, um so nach Inaktivierung über 30 Minuten bei $+ 58^{\circ}\text{C}$ (Wasserbad) die Ausgangsverdünnung 1 : 4 für die Serumtests herstellen zu können. Als Verdünnungsmittel diente physiologische Kochsalzlösung. Da die so gewonnenen Seren stark antikomplementär und zelltoxisch waren, wurden sie

Entnahme	A - C	Gruppen D - I	K - P
1	8 Tage nach G ₁	26 Tage nach G ₁	16 Tage nach G ₁
2	19 Tage nach G ₁	50 Tage nach G ₁ =24 " " G ₂	29 Tage nach G ₁ =13 " " G ₂
3	34 Tage nach G ₁ = 7 " " R	61 Tage nach G ₁ =35 " " G ₂ =11 " " R	43 Tage nach G ₁ =27 " " G ₂
4	47 Tage nach G ₁ =20 " " R	70 Tage nach G ₁ =44 " " G ₂ =20 " " R	57 Tage nach G ₁ =41 " " G ₂
5	78 Tage nach G ₁ =51 " " R =23 " " Ch		65 Tage nach G ₁ =49 " " G ₂ = 8 " " R
6			76 Tage nach G ₁ =60 " " G ₂ =19 " " R
7			84 Tage nach G ₁ =68 " " G ₂ =27 " " R
8			126 Tage nach G ₁ =110 " " G ₂ = 69 " " R = 22 " " Ch

G₁: Grundimmunisierung (1. Injektion) R: Reimmunisierung
G₂: Grundimmunisierung (2. Injektion) Ch: Challenge-Infektion

Tabelle 7: Zeitpunkt der Blutentnahmen nach Immunisierung von Goldhamstern

nochmals bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ über 90 Minuten bei 3000 U/Min. zentrifugiert und der Überstand vom Sediment abgegossen.

Das Ausgangsmaterial für die Serumuntersuchungen wurde bei $- 20^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.6. Challenge-Infektion

Die Belastbarkeit der Immunität prüften wir an den immunisierten Hamstern durch Challenge-Infektion. Als Challenge-Virus verwendeten wir den hamsterviruslenten Rhinopneumonitisvirusstamm Army 183 in der 5. Hamsterpassage. Zur Herstellung des Challenge-Virus wurden 7 Hamster mit jeweils 1 ml einer 10%igen Hamsterleberverreibung eines mit dem Stamm Army infizierten Hamsters intraperitoneal infiziert. Die Tiere starben zwischen Tag 2 und 7 post infectionem, die Lebern wurden steril entnommen, verrieben (10%ige Organverreibung) und bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ über 90 Minuten bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde bei $- 80^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Titration des Virus erfolgte wieder in Hamstern (siehe Tabelle 8).

In den Challenge-Versuchen wurden die immunisierten Hamster mit 1 ml Army 183, 5. Hamsterpassage (Titer: $10^{3,75}$ Hamster-LD₅₀/ml) in der Verdünnung 1 : 25 ($= 10^{2,35}$ LD₅₀/ml) intraperitoneal infiziert. Die Versuchstiergruppen A - C wurden 28 Tage, die Gruppen D - I 31 Tage, die Gruppen K - P 47 Tage nach der Reimmunisierung belastet. Parallel dazu wurden jeweils 12 nichtgeimpfte Kontrollhamster in gleicher Weise infiziert.

Rhinoepneumonitisvirus- stamm Army 183 Passage	Verdünnung	Infektions- dosis	Tierzahl	Anzahl toter Tiere / Gesamtzahl Tiere	Anzahl toter Tiere am Tag p.i. / Gesamtzahl toter Tiere						
					Tag p.i. 1	2	3	4	5	6	7
3. Hamsterpassage	1 : 10	1,0 ml	7	6 / 7	-	1 / 6	3 / 6	2 / 6	-	-	-
	1 : 10	1,0 ml	6	4 / 6	-	2 / 4	-	2 / 4	-	-	-
	1 : 50	1,0 ml	6	2 / 6	-	1 / 2	1 / 2	-	-	-	-
	1 : 100	1,0 ml	8	2 / 8	-	1 / 2	-	-	-	1 / 2	-
4. Hamsterpassage	1 : 1000	1,0 ml	8	1 / 8	-	-	1 / 1	-	-	-	-
	1 : 100	0,5 ml	10	6 / 10	-	1 / 6	4 / 6	1 / 6	-	-	-
	1 : 1000	0,5 ml	10	7 / 10	-	-	-	5 / 7	-	1 / 7	1 / 7
	1 : 10000	0,5 ml	10	2 / 10	-	-	2 / 2	-	-	-	-
5. Hamsterpassage	1 : 100	0,5 ml	10	6 / 10	-	1 / 6	4 / 6	1 / 6	-	-	-
	1 : 1000	0,5 ml	10	7 / 10	-	-	-	5 / 7	-	1 / 7	1 / 7
	1 : 10000	0,5 ml	10	2 / 10	-	-	2 / 2	-	-	-	-
	1 : 10000	0,5 ml	10	2 / 10	-	-	2 / 2	-	-	-	-

TABELLE 8 : ZÜCHTUNG UND TITRATION DES RHINOEPNEUMONITISVIRUSSTAMMES ARMY 183 IN HAMSTERN

3.1.7. Antikörpernachweis in den immunisierten Versuchstieren

Die Serumproben wurden auf das Vorliegen neutralisierender und komplementbindender Antikörper untersucht. In den Immunisierungsgruppen A - C (Hamster) wurden die Seren zum Teil paarweise gepoolt, die Seren der übrigen Versuchstiere wurden einzeln getestet.

3.1.7.1. Serumneutralisationstest (SN-Test)

Alle Serumproben wurden im Mikrotiterverfahren (21) untersucht. Getestet wurden die Verdünnungen 1 : 4, 1 : 8 und 1 : 16, falls der Endpunkt nicht erreicht wurde, folgte eine Nachtitration bis 1 : 64 in einem neuen Testansatz. Anfängliche Versuche, die Serumverdünnung 1 : 2 mit in den Test einzubeziehen, erwiesen sich als unbrauchbar, da in dieser Konzentration die Hamsterseren toxisch sind.

Als Antigen diente der Rhinopneumonitisvirusstamm RAC-H in der 12. bis 14. ENS-Passage. Das Virus wurde nach Titration in Röhrchenzellkulturen auf 80 KID₅₀/0,025 ml eingestellt. In Abweichung von der angeführten Methode verwendeten wir sekundäre ENS-Zellen, die mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen/ml angezüchtet wurden. Der Zellrasen war bei dieser Aussaat nach 2 Tagen 100% dicht.

Im Anzuchtmedium wurde der Prozentsatz der 0,5 molaren Natriumpyruvatlösung auf 5 % erhöht, auf den Zusatz von Vitaminen wurde verzichtet.

In jeden Ansatz wurden die folgenden Kontrollen einbezogen:

1. Serumkontrollen der im Test eingesetzten Seren in der Ausgangsverdünnung 1 : 4 (Prüfung auf zelltoxische Eigenschaften)
2. Negative Serumkontrolle (Nullserum eines Hamsters bzw. Meerschweinchens) in den Verdünnungen 1 : 4 bis 1 : 16
3. Positive Serumkontrolle (Serum eines Pferdes mit definiertem Rhinopneumonitis-Titer)
4. Normalkulturkontrolle
5. Antigenkontrolle

Die Reaktionsgemische wurden 3 Stunden bei + 4⁰C inkubiert und nach Zugabe der Zellen über einen Zeitraum von 8 Tagen bei + 37⁰C im CO₂-Brutschrank bebrütet. Der Test wurde täglich abgelesen, als Kriterium einer Virusvermehrung wurde das Auftreten von cytopathischen Veränderungen in den Zellkulturen gewertet. Kulturen, in denen kein cytopathischer Effekt auftrat, galten als positiv. Die Antikörpertiter berechneten wir nach der Methode von SPEARMAN-KÄRBER (188).

3.1.7.2. Komplementbindungsreaktion (KBR)

Die Seren aller Hamster aus den Versuchstiergruppen A - C sowie die Meerschweinchenserum wurden auf komplementbindende Antikörper untersucht. In den Gruppen D - I wurden lediglich die Seren der 1., 3. und 4. Blutentnahme, in den Gruppen K - P die Seren der 2., 6. und 8. Blutentnahme getestet; die Untersuchungen auf komplementbindende Antikörper beschränkten sich in den Versuchstiergruppen D - P auf Tiere, die die wiederholten Herzpunktionen im Verlaufe des Immunisierungsversuches bis zur letzten Blutentnahme überstanden hatten. Die Auswahl einzelner Entnahmezeitpunkte bei den Gruppen D - P wurde nach Abschluß der jeweiligen Immunisierungsversuche, ausgehend von den Ergebnissen der Neutralisationstests getroffen, um einen orientierenden Überblick über den Verlauf der Bildung komplementbindender Antikörper nach Immunisierung, Reimmunisierung und Challenge-Infektion zu erhalten und einen Vergleich zu den Titern der gebildeten neutralisierenden Antikörper herstellen zu können.

Für die Durchführung der Komplementbindungsreaktion verwendeten wir zwei verschiedene Methoden:

1. Die Seren der Gruppen A - C (Hamster) wurden unter Verwendung eines Hamsterleber-Rhinopneumonitisantigens in der Makromethode (Röhrchenmethode) unter Anwendung der Kältebindung untersucht. Die modifizierte Technik von KOLMER und BOERNER (102) beschreibt PETZOLDT (147).

In Abweichung von dieser Methode errechnete sich die Gebrauchsverdünnung des Komplements aus der

im Vorversuch jeweils ermittelten mittleren lösenden Dosis durch Erhöhung der Komplementkonzentration um 2 %. Im Hauptversuch wurde dann 0,1 ml dieser Gebrauchsverdünnung zugesetzt. - Wir arbeiteten mit 4 komplementbindenden Einheiten des Antigens. - Nach Zugabe des hämolytischen Systems zum Serum-Antigen-Komplement-Gemisch wurde für 30 Minuten bei + 37°C inkubiert. Die erste Ablesung des Tests erfolgte dann sofort, die zweite nach 1-stündigem Sedimentieren bei Zimmertemperatur.

Das komplementbindende Antigen wurde ebenso hergestellt wie das Challenge-Virus.

Getestet wurden die Seren in den Verdünnungen 1 : 4 bis 1 : 64.

2. Da sich die Hamsterleberantigene stark antikomplementär verhielten, und damit die Röhrchentests nur unter Verwendung hoher Komplement-Gebrauchsdosen durchführbar waren, verwendeten wir in allen folgenden im Mikrotitersystem durchgeführten Komplementbindungsreaktionen ein Rhinopneumonitisantigen, das über Zellkulturinfektion gewonnen worden war. Als Zellkultursystem dienten BHK₂₁-Zellen, in denen das Virus nach der von MUBIRU (139) beschriebenen Methode gezüchtet wurde. In der KBR wurde der Stamm RAC-H in der 10. ENS-, 7. BHK-Passage eingesetzt. Bei dem Versuch, die Serum-Antigen-Komplementgemische im Mikrotitersystem bei + 4°C über 18 Stunden zu binden, stellte sich heraus, daß das Zellkulturantigen während dieser Inkubationszeit eine starke antikomplementäre Wirkung entwickelte. Daher führten wir im folgenden die Komplementbindungsreaktion bei Wärmebindung (+ 37°C)

durch. Vergleichende Untersuchungen bereits in der Röhrenmethode vorgetesteter Hamsterseren ergaben für den Test bei Wärmebindung eine optimale Bindungszeit von 2 Stunden.

Für die KBR im Mikrotitersystem verwendeten wir "Diluter" mit einem Fassungsvermögen von 0,025 ml und auf 0,025 ml geeichte Tropfpipetten (beides von der Firma Cooke Engineering Company, Virginia). Durchgeführt wurde der Test in sogenannten U-Platten (Linbro IS-MRC-96, Gateway International, California).

Die von Mc GUIRE (132) speziell für equine Herpesviren angewendete KBR-Mikrotechnik wurde hinsichtlich Bindungstemperatur und -zeit modifiziert (s.o.); im Hauptversuch wurde mit 4 KBE des Antigens gearbeitet; nach Zusatz des hämolytischen Systems wurde 30 Minuten inkubiert und dann direkt abgelesen. Die Seren wurden in Verdünnungen von 1 : 4 bis 1 : 512 getestet.

Bei beiden Methoden wurden Serum- und Normalantigenkontrollen (Hamsterleber-Normalantigen bzw. BHK₂₁-Zellkultur-Normalantigen) parallel zu jeder Serumtitration angesetzt; durch Antigenkontrollen sowie eine positive und eine negative Serumkontrolle wurde jeder Versuchsansatz abgesichert.

Die Ablesung erfolgte bei beiden Techniken anhand der 100%-Methode, wobei Reaktionen bis zu 2+ als positiv gewertet wurden.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Zellkulturen

Auf der Suche nach einem für die Rhinopneumonitisviruszüchtung optimalen Zellsystem hatten wir neben primären und sekundären Schweinenierenkulturen (ENS) und der Kaninchennierenzelllinie RK₁₃ die permanenten Affennierenzelllinien MS-LLC-MKII und Vero sowie die Hamsternierenzellkultur BHK₂₁ auf ihre Sensibilität gegenüber EHV₁ untersucht. Beide Affennierenzelllinien erwiesen sich als unempfindlich für den Stamm RAC-H in dessen niederen und hohen Passagen; auf BHK₂₁ vermehrte sich das Virus zwar, der intensive Stoffwechsel dieser Zellen führte jedoch zu Zellalterung und Zelltod bevor das Virus das Vermehrungsoptimum erreicht hatte. Aus diesen Gründen arbeiteten wir im folgenden nur noch mit ENS und RK₁₃.

Da Primärkulturen - speziell von Schweinenieren - häufig Fremdvirus enthalten, verwendeten wir nach anfänglichen orientierenden Versuchen nur noch Sekundärkulturen. Viruskontamination konnte hierdurch ausgeschlossen oder frühzeitig nachgewiesen werden.

Bei dem Versuch, tertiäre Schweinenierenkulturen zu verwenden, stellten wir fest, daß diese im Vergleich zu Sekundärkulturen an Sensibilität gegenüber EHV₁ verlieren.

3.2.2. Einschritt-Vermehrung

Der Rhinopneumonitisvirusstamm RAC-H in der 13. ENS-Passage mit einem Infektiositätstiter von $10^{7,25}$ KID₅₀/ml war auf RK₁₃- und ENS-Kulturen unter Verwendung von proteinhaltigem, sowie auf eine ENS-Kultur unter Verwendung von proteinfreiem Erhaltungsmedium verimpft worden.

Die Titration der zu unterschiedlichen Zeitpunkten (s. Tabelle 9) während der ersten 12 Stunden gezogenen Proben ergab, daß nach Infektion von RK₁₃-Zellkulturen in proteinhaltigem Erhaltungsmedium während der logarithmischen Phase der Virusvermehrung die meisten infektiösen Partikel ausgeschleust wurden, zur 12. Stunde p.i. betrug der Infektiositätstiter im Überstand der infizierten Zellkultur $10^{7,5}$ KID₅₀/ml. Bei Verwendung von ENS-Zellkulturen mit proteinhaltigem Medium wurden zum gleichen Zeitpunkt Titer von $10^{6,75}$ KID₅₀/ml und bei Verwendung von ENS-Kulturen mit proteinfreiem Medium Titer von $10^{3,75}$ KID₅₀/ml nachgewiesen.

Zur 24. Stunde p.i. hatte das auf ENS mit proteinhaltigem Erhaltungsmedium gezüchtete Virus mit $> 10^{8,25}$ KID₅₀/ml den Maximaltiter erreicht, die analogen Werte für RK₁₃ und proteinhaltiges Medium betrugen zum gleichen Zeitpunkt $10^{7,75}$ KID₅₀/ml, die für ENS und proteinfreies Medium $10^{6,25}$ KID₅₀/ml. Die Titer des auf RK₁₃ vermehrten Virus erreichten erst zur 48. Stunde p.i. ihr Maximum mit $10^{8,0}$ KID₅₀/ml, die des auf ENS unter Verwendung von proteinfreiem Erhaltungsmedium gezüchteten Virus zur 56. Stunde mit $10^{7,0}$ KID₅₀/ml. Diese Infektiositätstiter waren jeweils zum Zeitpunkt

Zellkultursystem	Erhaltungsmedium	Infektiositätstiter $[-\log(KID_{50})/ml]$ im Medium													
		Stunden p.i.													
		1	2	4	6	8	10	12	24	28	48	56	72	96	120
RK ₁₃	TC 199 mit Proteinen	2,50	3,75	4,25	5,50	6,75	7,00	7,50	7,75	7,75	8,00 *)	7,50	6,50	6,50	6,50
		n.t.	n.t.	n.t.	3,75	n.t.	n.t.	6,75	8,25 *)	n.t.	7,50	n.t.	6,75	6,50	n.t.
ENS	Earle mit Proteinen	n.t.	n.t.	n.t.	1,00	n.t.	n.t.	3,75	6,25	n.t.	n.t.	7,00 *)	7,00	6,50	n.t.
		n.t.	n.t.	n.t.	1,00	n.t.	n.t.	3,75	6,25	n.t.	n.t.	7,00 *)	7,00	6,50	n.t.

*) Zeitpunkt der 100 %igen viruspezifischen Zerstörung der Zellkultur

TABELLE 9 : Einschritt-Vermehrung des Rhinopneumonitisvirusstammes RAC-H (Animpfmaterial : RAC-H 13,ENS-Passage, Infektiositätstiter: $10^{7,25} KID_{50}/ml$)
auf ENS- und RK₁₃-Kulturen unter Verwendung verschiedener Erhaltungsmedien

der 100 % virusspezifischen Zerstörung der Zellkultur nachweisbar.

Auf Grund der Thermoinaktivierung des liberierten Virus waren zur 96. Stunde p.i. unter allen Versuchsbedingungen Infektiositätsverluste festzustellen, die KID_{50} betrug einheitlich $10^{6,5}/ml$.

3.2.3. Gewinnung des Saatvirus

RAF und Earle als Erhaltungsmedien wurden vergleichend hinsichtlich ihrer Eignung zur Gewinnung des Rhinopneumonitisvirus über Gefriertauen und zur Lagerung des geernteten Virus bei $-80^{\circ}C$ getestet.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 10 wiedergegeben. Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß Earle hinsichtlich seiner stabilisierenden Fähigkeiten unter den Bedingungen der Lagerung bei $-80^{\circ}C$ der Rinderamnionflüssigkeit überlegen war. Während nach der Gewinnung des Virus über Gefriertauen vergleichsweise keine Titerverluste festzustellen waren, sank der Infektiositätstiter im zellfreien Material bei Verwendung von RAF als Erhaltungsmedium nach Lagerung bei $-80^{\circ}C$ um $1,5 \log KID_{50} /ml$.

Virusernte	Lagerung 24 Std. bei	Erhaltungs- medium	Titer nach Lage- rung [-log (KID ₅₀)/ml]
ohne Gefriertauen	+ 4°C	Earle RAF	6,5 6,5
	- 80°C	Earle RAF	6,5 5,0
mit Gefriertauen	+ 4°C	Earle RAF	6,5 6,5
	- 80°C	Earle RAF	6,5 5,0

Tabelle 10: Einfluß von Earle und RAF als Erhaltungs-
medium auf die Infektiosität bei Ernte
und Lagerung von Rhinopneumonitisvirus
(Stamm RAC-H, 14. ENS-Passage)

3.2.4. Virusinaktivierung

3.2.4.1. Thermoinaktivierung

Die Ergebnisse der Thermoinaktivierungsversuche sind in der Tabelle 11 aufgeführt.

Die Inaktivierung von Rhinopneumonitisvirus durch Hitzeeinwirkung war grundsätzlich möglich; dies war bei der Thermolabilität von Herpesviren auch zu erwarten. Der Inaktivierungserfolg steht hierbei in Abhängigkeit zu der im jeweils verwendeten Gefäßsystem herrschenden Innentemperatur. Gegen die Verwendung von Glasröhrchen als Behälter sprechen deren meist uneinheitliche Glaswandstärke und ihre unterschiedlichen Lumina; beides bedingt bei konstanter Außentemperatur des verwendeten Wasserbades schwankende Temperaturen im Inneren des Gefäßes. Daraus ergaben sich unterschiedliche Inaktivierungserfolge, wie aus der Tabelle 11 ersichtlich ist. Als minimale Inaktivierungszeit bei Verwendung von Glasröhrchen und einer Temperatur des Wasserbades von $+ 99^{\circ}\text{C}$ konnten wir 30 Sekunden ermitteln. Die Unsicherheit des Systems wird aber daraus erkennbar, daß wir bei gleicher Temperatur und gleichen Infektiositätstitern des Virusausgangsmaterials nach 45 Sekunden Einwirkungszeit noch eine Restinfektiosität mit einer KID_{50} von $10^{1,5}/\text{ml}$ nachweisen konnten.

Als technisch sicherer erwies sich die Verwendung von Dialyseschläuchen, die die Einhaltung konstanter Bedingungen ermöglichte. Bei Einsatz dieser Methode waren 1,5 Minuten bei einer Wasserbadtemperatur von $+ 99^{\circ}\text{C}$ nötig, um eine völlige Inaktivierung von Rhinopneumonitisvirus mit einem

Infektiositätstiter von $10^{6,0}$ KID₅₀/ml zu erreichen. Die Schwierigkeit der Abfülltechnik und der Rückgewinnung des Versuchsmaterials aus den Dialyseschläuchen ließ uns diese Methode als ungeeignet erscheinen, so daß die Versuche bei einer Inaktivierungszeit von 1,5 Minuten abgebrochen wurden.

Die besten Ergebnisse erzielten wir bei der Thermo-inaktivierung nach Verwendung von Silikon-schläuchen im Durchflußverfahren mit einer Rotationspumpe. Die einzige Unsicherheit, die in diesem System liegt, kann bei Verwendung geringer Mengen virushaltiger Medien auftreten; kleine Flüssigkeitsvolumina werden nicht kontinuierlich durch das Schlauchsystem gepumpt, sondern können bei der Erhitzung turbulenzartig beschleunigt werden, so daß hieraus eine unkontrollierbare Verkürzung der effektiven Inaktivierungszeit entstehen kann.

Ein vollständiger Infektiositätsverlust von Rhinopneumonitisvirus (Titer: $10^{7,75}$ KID₅₀/ml) in proteinhaltigem und proteinfreiem Erhaltungsmedium wurde im Silikonschlauch-Durchflußverfahren bei einer Wasserbadtemperatur von + 99°C schon nach 15 bzw. 13 Sekunden erreicht. Verkürzten wir diese Zeit auf 10 Sekunden, so gelang keine vollständige Inaktivierung, bei der Titration des Versuchsmaterials in ENS-Kulturen war noch eine Restinfektiosität von $10^{1,5}$ KID₅₀/ml nachweisbar.

Inaktivierungszeit	Temperatur des Inaktivierungsmediums	Passagenzahl	Titer des Testvirus vor Inaktivierung [10^5 EID ₅₀ /ml]	Erhaltungsmedium	Virus abgefüllt in	Testvirus Inaktivierungserfolg
3,0 ; 3,0 und 1,5 Min.	+ 39° C	PAL-H 9, ENS	6,00	Farbe proteinhaltig	Dialysen- schläuchen	vollständige Inaktivierung schon nach 1,5 Min.
1,5 und 1,0 Min. 45, 30 und 15 Sek.	+ 39° C	PAL-H 9, ENS	6,00	Farbe proteinhaltig	Clare- röhren	vollständige Inaktivierung: 1,0 Min. und 30 Sek. Restinfektiosität : 1,5 Min. ; (über: 1,2%) 45 Sek. ; (über: 1,1%) 15 Sek. ; (über: 0,2%)
20 und 15 Sek.				TC 199 proteinhaltig		vollständige Inaktivierung schon nach 15 Sek.
20, 15 und 10 Sek.	+ 39° C	PAL-H 9, ENS	7,75	TC 199 proteinlos	Clare- schläuchen	vollständige Inaktivierung: 20 und 15 Sek. Restinfektiosität : 10 Sek. ; Titer: 1,2%
15 Sek.				TC 199 proteinfrei		vollständige Inaktivierung

TABELLE 11 : ERGEBNISSE DER THERMOINAKTIVIERUNGSVERSÜCHE MIT PHINDIPLODIPNUSVIRUS*, STAMM RAG-H IN DER 9. ENS-PASSAGE

3.2.4.2. Inaktivierung mit Betapropiolakton (BPL)

Der Angriffspunkt des Betapropiolakton sind die Hydroxyl-, Amino-, Carboxyl-, Sulfhydryl- und Phenolgruppen von Proteinen. Unterschiede hinsichtlich der Wirkung auf Virusproteine oder Mediumproteinbestandteile sind nicht zu erwarten. Um dies zu klären, haben wir in unseren BPL-Inaktivierungsversuchen zunächst sowohl mit Virus, das in proteinhaltigem Erhaltungsmedium gezüchtet worden war, als auch mit Virus in proteinreduziertem und proteinfreiem Medium gearbeitet.

Die Ergebnisse der Inaktivierungsversuche von Rhinopneumonitisvirus - Stamm RAC-H in niederen und hohen Passagen - mit BPL sind in der Tabelle 12 zusammengefaßt.

Parallel zu den Inaktivierungsversuchen hatten wir Temperaturkontrollversuche durchgeführt, um auf diese Art und Weise den möglichen unspezifischen Titerverlust erfassen zu können. Der Rhinopneumonitisvirusstamm erlitt bei einer Inkubationstemperatur von + 4°C während 144 Stunden keinen Infektiositätsverlust. Erwartungsgemäß trat bei einer Inkubationstemperatur von + 37°C ein Titerverlust auf, der nach 120-stündiger Inkubation 2,25 log KID₅₀/ml betrug; bei Inkubationszeiten unter 10 Stunden war dagegen bei den Temperaturkontrollen kein Titerverlust festzustellen. Lediglich der hochpassierte Stamm RAC-H wurde in seinem Verhalten gegenüber Raumtemperatur geprüft, nach 144 Stunden sank der Virustiter um 1,5 log KID₅₀/ml.

Die effektive chemische Inaktivierung des RAC-H-Stammes ist also bei der Inkubationstemperatur von $+ 4^{\circ}\text{C}$ als spezifisch anzusehen; dies gilt für die Inaktivierung bei $+ 37^{\circ}\text{C}$ nur bei Inkubationszeiten von weniger als 10 Stunden, bei längerer Inkubationsdauer beruht der Infektiositätsverlust auf thermischer und chemischer Teilwirkung.

Das positive Ergebnis des Inaktivierungsversuches mit dem Stamm C 6505 ist - wie aus der Tabelle ersichtlich - auf dessen starke Thermolabilität bei $+ 37^{\circ}\text{C}$ und zusätzlich wohl auf den geringen Titer des Ausgangsmaterials zurückzuführen. Allein durch die Temperatureinwirkung trat nach 120 Stunden ein Verlust der Infektiosität um $3,25 \log \text{KID}_{50}/\text{ml}$ auf.

Nachdem wir herausgefunden hatten, daß bei einer Inaktivierungstemperatur von $+ 37^{\circ}\text{C}$ nach 10 Stunden eine vollständige Inaktivierung des Rhinopneumonitisvirus erreicht werden konnte, ermittelten wir zunächst die minimale noch wirksame BPL-Konzentration. Danach wurde unter Konstanthaltung der Endkonzentration von 0,15 % BPL die Inkubationsdauer verkürzt. Bei Inkubationszeiten unter 2 Stunden hatten die auf Zellkulturen angezüchteten Versuchsgemische eine toxische Wirkung. Der Zellrasen wurde durch einen virusfreien Kontrollansatz eines BPL-Medium-Gemisches, das unter gleichen Bedingungen inkubiert und gelagert worden war, gleichermaßen zerstört. Da die kurze Inkubationszeit bei $+ 37^{\circ}\text{C}$ und die anschließende Lagerung bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ offenbar nicht ausreichten, überschüssiges BPL zum vollständigen Zerfall in β -Hydroxypropionsäure und β -Chlor-

BPL-Eindkonz. [%]	Testvirus Passagenzahl	Titel des Testvirus vor Inaktivierung [-log(KID ₅₀)/ml]	Erhaltungsmedium	Inkubations- temperatur	Inkubations- zeit [h]	Lagerung bei 4°C	Inaktivierungserfolg	Titel der Temperaturkontrollen [-log(KID ₅₀)/ml]
0,0003	RAC-H 10.ENS	7,00	Earle bzw. TC 199 proteinhaltig	+ 4°C	144	25 Std.	Restinfektiosität Titer: >4,50	7,00
	RAC-H 268.ENS	6,75		Raumtemp.	144		Restinfektiosität Titer: >4,50	5,75
	C 6505 12.ENS	4,75		+ 37°C	120		vollständige Inaktivierung	1,50
	RAC-H 11.ENS	5,50		+ 37°C	120		Restinfektiosität Titer: 3,75	3,25
0,03	RAC-H 11.ENS	7,00	TC 199 proteinarm	+ 37°C	120	25 Std.	Restinfektiosität Titer: 1,50	7,00
0,05	RAC-H 10.ENS	7,00			144		Restinfektiosität Titer: 2,00	7,00
	1. RK 15				144		Restinfektiosität Titer: 2,75	
0,053	RAC-H 10.ENS	6,25			120		Restinfektiosität Titer: >2,75	6,25
0,30 ; 0,20 ; 0,15 und 0,10	RAC-H 10.ENS, 2. RK 15	7,00	Earle proteinfrei	+ 37°C	10	statt Lagerung bei 4°C Dialyse	vollständige Inaktivierung: 0,30 ; 0,20 und 0,15% BPL Restinfektiosität: 0,10% BPL Titer: 0,75	6,75
					10, 8, 6, 4, 2 Std.		vollständige Inaktivierung	10 Std: 7,25 <10 Std: 7,50
					90, 60, 45, 30, 20, 15, 10 und 5 Min.		nicht auswertbar wegen noch vorhandener BPL-bedingter Zelltoxizität	
0,15	RAC-H 14.ENS	7,50			90, 60, 45, 30, 20, 15, 10 und 5 Min.		vollständige Inaktivierung	

TABELLE 12: ERGEBNISSE DER INAKTIVIERUNGSVERSÜCHE DES RHINOPHARYNGITISVIRUS (STÄMME RAC-H UND C 6505) MIT BETAPRODOTOLAKTON (BPL)

propionsäure zu bringen, oder auch diese Zerfallsprodukte noch toxisch waren, entfernten wir in diesen letzten Versuchen das nach der Inaktivierung noch verbliebene BPL bzw. dessen Zerfallsprodukte durch 1-stündige Dialysierung gegen phosphatgepufferte Kochsalzlösung bei + 4°C.

Bis zu einer BPL-Endkonzentration von 0,10 % gelang es nach 10-stündiger Inkubation bei + 37°C - auch bei Verwendung von Virus in sogenanntem proteinarmem Erhaltungsmedium - nicht, Rhinopneumonitisvirus vollständig zu inaktivieren. Die effektive minimal notwendige BPL-Endkonzentration lag bei 0,15 % nach Verwendung von Virus in proteinfreiem Erhaltungsmedium. Die Inaktivierungszeit konnten wir bei der Inkubationstemperatur von + 37°C auf 5 Minuten verkürzen, ohne daß über die 3 nach der Inaktivierung angesetzten Passagen des inaktivierten Materials auf sekundären ENS-Kulturen noch eine Restinfektiosität nachweisbar war. Die in den vorausgegangenen Versuchen an den eigentlichen Inaktivierungsprozeß angeschlossene Lagerung bei + 4°C war demnach nicht als "Nachinaktivierung" aufzufassen.

3.2.4.3. Inaktivierung mit Acetyläthylenimin (AEI)

In den Versuchen, Rhinopneumonitisvirus (Stamm RAC-H, 10. - 14. ENS-Passage) mit AEI zu inaktivieren, bestimmten wir zunächst die zur Inaktivierung notwendige AEI-Minimalkonzentration unter den in der Literatur beschriebenen Inkubationsbedingungen

von 16 Stunden und + 37°C (204). Hierbei führten AEI-Endkonzentrationen von 0,75 bis 0,066 % bei Verwendung von Virus in proteinhaltigem Earle zur völligen Inaktivierung (s. Tabelle 13). Verringerten wir unter gleichen Bedingungen die AEI-Konzentration bis auf 0,05 %, so war noch eine Restinfektiosität des Virus mit einem Titer von $>10^{1,75} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ vorhanden. Ersetzten wir das proteinhaltige Medium durch proteinarmes oder proteinfreies Medium, so konnten wir die AEI-Konzentration bis auf 0,03 % reduzieren und erzielten damit eine vollständige Inaktivierung von Rhinopneumonitisvirus mit einem Ausgangstitern von $10^{7,75} \text{KID}_{50}/\text{ml}$. Eine Verkürzung der Inkubationszeit unter 16 Stunden blieb ohne Erfolg, schon eine Reduzierung auf 14 Stunden Inkubationszeit bei Verwendung von 0,03 % AEI führte dazu, daß in dem inaktivierten Material eine Restinfektiosität von 0,75 log $\text{KID}_{50}/\text{ml}$ erhalten blieb, die in der 2. Subpassage des Versuchsgemisches auf sekundären ENS nachzuweisen war. Weitere Verkürzung der Inaktivierungszeiten hatte zur Folge, daß bereits in den Anzuchtpassagen des jeweiligen Versuchsmaterials virusspezifische cytopathische Veränderungen auftraten, die Höhe der Infektiositätstiter war umgekehrt proportional der Inkubationsdauer (s. Abb. 1). Parallel zu den Inaktivierungsversuchen hatten wir wieder Temperaturkontrollen angesetzt. Eine thermische Inaktivierung von Rhinopneumonitisvirus zwischen 16 und 10 Stunden Inkubation bei + 37°C fand nur in sehr geringem Umfange statt, der Verlust der Infektiosität betrug in diesem Zeitraum 0,25 log $\text{KID}_{50}/\text{ml}$. Eine weitere Verkürzung der

AEI-Endkonz. [%]	Testvirus Passagenzahl	Titel des Testvirus vor Inaktivierung [$-\log(KID_{50})/ml$]	Erhaltungsmedium	Inkubations- zeit bei $+37^{\circ}C$ [h]	Inaktivierungserfolg	Titel der Temperaturkontrollen [$-\log(KID_{50})/ml$]
0,75 ; 0,50 ; 0,20 ; 0,15 und 0,10	RAC-H 10. ENS	7,50			vollständige Inaktivierung bis 0,10 % AEI	7,25
	RAC-H 11. ENS	6,00	Earle proteinhaltig	16	vollständige Inaktivierung bis 0,066 % AEI	5,75
0,05	RAC-H 11. ENS	7,25			Restinfektiosität Titel : $>1,75$	7,00
	RAC-H 10. ENS, 1. RK ₁₅	6,75			vollständige Inaktivierung bis 0,03 % AEI	6,50
0,066 ; 0,04 und 0,03	RAC-H 10. ENS 1. RK ₁₅	6,25	TC 199 proteinarm	16	Restinfektiosität: $\begin{cases} 0,02 \% \text{ AEI ; } & \text{Titel : } >4,5 \\ 0,01 \% \text{ AEI ; } & \text{Titel : } >5,5 \end{cases}$	6,00
	RAC-H 10. ENS	6,75		16	vollständige Inaktivierung	6,50
0,03	RAC-H 10. ENS				vollständige Inaktivierung bei 16 Stunden	
	RAC-H 14. ENS	7,75	Earle proteinfrei	16, 14, 12, 10, 5, 2 und 1 Std. Restinfektiosität	$\begin{cases} 14 \text{ Std. ; } & \text{Titel : } 0,75 \\ 12 \text{ Std. ; } & \text{Titel : } 1,50 \\ 10 \text{ Std. ; } & \text{Titel : } 1,75 \\ 5 \text{ Std. ; } & \text{Titel : } 5,25 \\ 2 \text{ Std. ; } & \text{Titel : } 7,00 \\ 1 \text{ Std. ; } & \text{Titel : } 7,25 \end{cases}$	bis 10 Std. : 7,50 < 10 Std. : 7,75

TABELLE 13 : ERGEBNISSE DER INAKTIVIERUNGSVERSÜCHE DES RHINOPHEUMONITISVIRUSSTAMMES RAC-H MIT ACETYLÄHYMINEN (AEI)

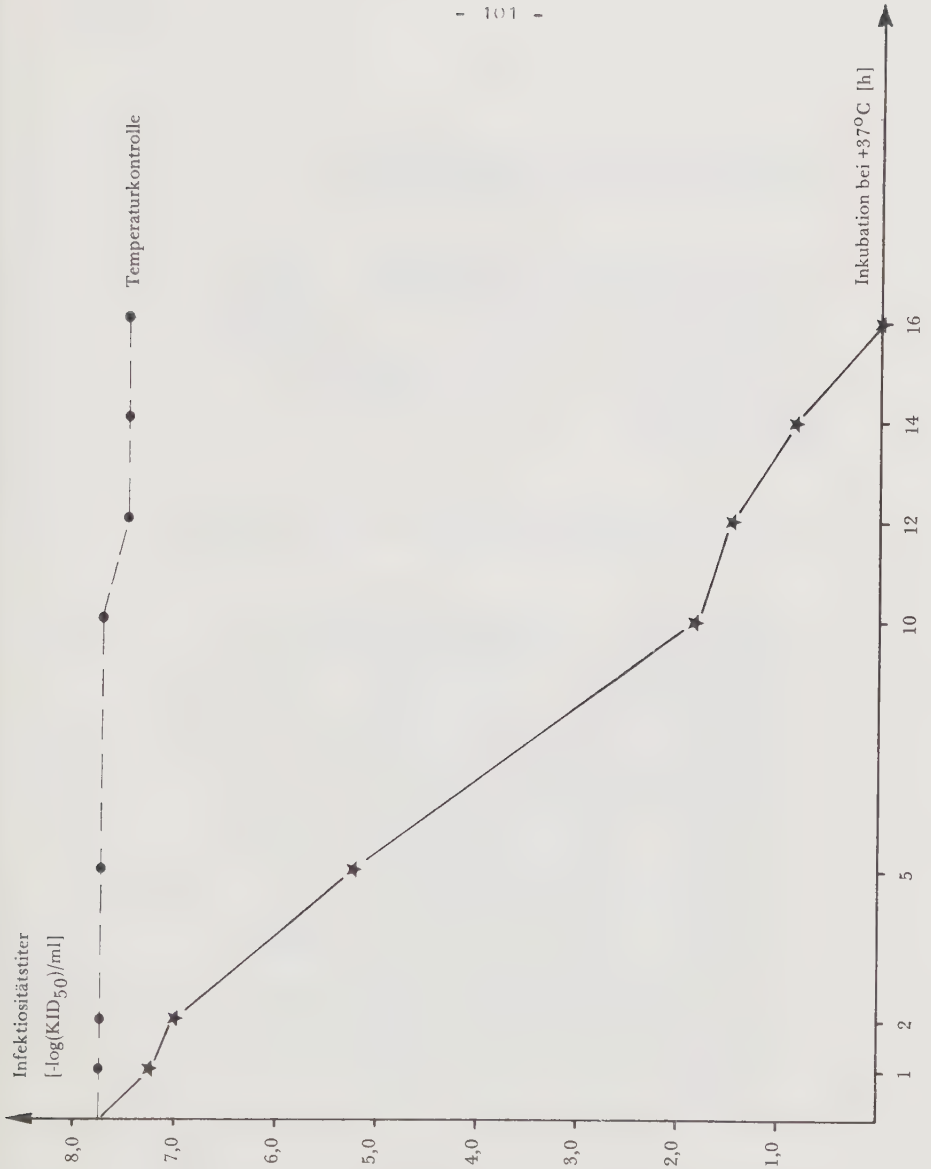


Abbildung 1: AEI-INKTIVIERUNGSKURVE DES RHINOPNEUMONITIS-STAMMES RAC-H, 14.ENS-PASSAGE
(INFEKTIOSITÄTSTITER: $10^{7,75}$ KID₅₀/ml;
AEI-INKTIVIERUNG: 0,03 % AEI, 16 STUNDEN, +37°C)

Inkubationszeit bei + 37°C hatte keine Thermo-inaktivierung mehr zur Folge.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß die minimale wirksame Grenzkonzentration zur Inaktivierung von Rhinopneumonitisvirus mit AEI bei 0,03 % liegt, die minimal notwendige Inaktivierungszeit beträgt 16 Stunden bei einer Temperatur von + 37°C.

3.2.5. Immunisierung von Hamstern und Challenge-Infektion

Um den Einfluß der angewendeten Immunisierungsverfahren auf die Antigenstruktur und damit die Immunogenität des Rhinopneumonitisvirus zu testen, hatten wir erwachsene weibliche syrische Goldhamster immunisiert und ihre humoralen Antikörper untersucht. Zur Prüfung des durch die Immunisierung erhaltenen Impfschutzes wurden die Hamster mit vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus, Stamm Army 183, infiziert. Nach dieser Belastungsinfektion prüften wir das klinische Verhalten der Hamster und testeten deren immunologische Reaktion auf die Infektion über die Untersuchung der Seren auf neutralisierende und komplementbindende Antikörper.

3.2.5.1. Thermoinaktiviertes Rhinopneumonitisvirus als Immunisierungsantigen

Thermoinaktiviertes Rhinopneumonitisvirus wurde lediglich in einer Versuchstiergruppe, bestehend aus 8 Hamstern, bezüglich seiner Immunogenität untersucht.

Zur Thermoinaktivierung hatten wir den Rhinopneumonitisvirusstamm RAC-H in der 10. ENS-, 2. RK₁₃-Passage mit einem Titer von 7,25 log KID₅₀/ml verwendet. Das Virus war bei einer Inaktivierungstemperatur von + 95°C während 13 Sekunden im Silikonschlauch-Durchflußverfahren vollständig inaktiviert.

Immunisierungsschema und Daten der Blutentnahmen sind den entsprechenden Tabellen im Kapitel Material und Methoden zu entnehmen (Versuchstiergruppe C). Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen nach Immunisierung mit thermoinaktiviertem Rhinopneumonitisvirus sind aus der Abbildung 2 ersichtlich. Aus arbeitstechnischen Gründen hatten wir unsere serologischen Untersuchungen zunächst an gepoolten Seren durchgeführt. Für die Hamsterguppen A - C können deshalb keine individuellen Angaben über die Antikörperbildung nach Immunisierung gemacht werden.

Nach der Immunisierung von Goldhamstern mit thermoinaktiviertem Virus wurden lediglich komplementbindende Antikörper gebildet, neutralisierende Antikörper konnten 20 Tage nach der Reimmunisierung nur in einem Serumpool nachgewiesen werden (Titer: 1 : 4).

Die Bildung komplementbindender Antikörper setzte nach der ersten Injektion der Grundimmunisierung

ein, die erreichten Titer betrugen maximal 1 : 8 am Tag 8 p.vacc. und 1 : 16 am Tag 19 p.vacc. Die Reimmunisierung hatte keinen Einfluß auf das kontinuierliche Absinken dieser Antikörper bis zum 20. Tag danach, lediglich in einem Serumpool war der Titer von 1 : 16, der schon zum 19. Tag nach Grundimmunisierung nachweisbar gewesen war, wieder vorhanden.

Titer
↑
komplementbindende
Antikörper
1:64

Titer
↑
komplementbindende
Antikörper
1:64

IMMUNISIERUNGSGRUPPEN

- A (BPL-INAKTIVIERTES VIRUS)
- E (AEI-INAKTIVIERTES VIRUS)
- C (THERMOINAKTIVIERTES VIRUS)



Titer
↑
neutralisierende
Antikörper
>1:24

Titer
↑
neutralisierende
Antikörper
>1:24

Abb. 2: BILDUNG VON KOMPLEMENTBINDENDEN UND NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPERN NACH IMMUNISIERUNG VON HAMSTERN MIT INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONIEVIRUS (GRUPPEN A, E UND C; SERUMCOL-UNTERSUCHUNGEN)

n. A₁/B₂/R/Ch: siehe Abbildung 5

n.t.: nicht getestet

3.2.5.2. BPL-inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus als Immunisierungsentigen

Insgesamt 54 Hamster wurden mit BPL-inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus immunisiert und Antikörperbildung und -verlauf bei den Tieren kontrolliert. Die in diesem Versuch verwendeten Antigene sind zum besseren Verständnis - entsprechend ihrer Verwendung in den einzelnen Hamstergruppen - in der folgenden Tabelle nochmals zusammengefaßt:

Versuchstier- gruppe	Testvirus Passagenzahl	Titer vor Inaktivierung $\left[-\log(KID_{50})/ml \right]$	BPL-Inaktivierung bei $+37^{\circ}C$		Verwendung von Adjuvantien bei Immunisierung
			BPL-Endkonz.	I.-zeit	
A	RAC-H 10.ENS, 2. RK ₁₃	7,25	0,20 %	10 Std.	-
D	RAC-H 11.ENS	7,00	0,15 %	10 Std.	-
E					Adj. 1 / Adj. 2
K	RAC-H 14.ENS	7,75	0,15 %	2 Std.	Adj. 3
L					Adj. 4
M					-

Adj. (= Adjuvans) 1, 2, 3, 4 : siehe Tabelle 6

Endkonz. : Endkonzentration

I.-zeit : Inaktivierungszeit

TABELLE 14 : BPL-INAKTIVIERTE RHINOPNEUMONITISANTIGENE, DIE ZUR IMMUNISIERUNG EINGESETZT WURDEN

Die verwendeten Adjuvantien, Immunisierungspläne und Daten der Blutentnahmen in den jeweiligen Versuchstiergruppen sind den Tabellen 5 und 7 im Kapitel Material und Methoden zu entnehmen. Die Ergebnisse der Serumpool-Untersuchungen (Gruppe A) sind aus der Abbildung 2 ersichtlich. In den Gruppen D, E, K, L und M wurden generell Einzelseren auf neutralisierende und komplementbindende Antikörper getestet. Diese Ergebnisse sind in den Tabellen 15, 16, 17 und 18 und in den Abbildungen 3, 4, 5 und 6 wiedergegeben. Einige Hamster starben bei den Blutentnahmen, in den Tabellen sind die so entstandenen Lücken durch Striche markiert. Nicht getestete Serumentnahmen sind mit n.t. gekennzeichnet.

Wenn wir zunächst den Einfluß der Inaktivierungszeit auf die Antigenität von Rhinopneumonitisvirus über die Stimulierung von humoral nachweisbaren Antikörpern in damit immunisierten Hamstern prüfen, so ergibt sich eine mögliche direkte Korrelation zwischen Einwirkungsdauer des BPL und Antigenitätsverlust des inaktivierten Virus. Es muß einschränkend dazu angeführt werden, daß das bei zwei Stunden inaktivierte Virus, das in diesem Versuch eingesetzt wurde, ursprünglich einen Infektiositätstiter hatte, der bis zu $0,75 \log \text{KID}_{50}/\text{ml}$ über dem des Virus lag, das über 10 Stunden inaktiviert wurde. Aus dem später zu besprechenden Ergebnis der Immunisierungsversuche mit AEI-inaktiviertem Virus wird ersichtlich, daß dieser Titerunterschied sich deutlich auf den Immunisierungserfolg auswirkt.

Hatten wir Hamster ohne Adjuvanzzusatz mit Rhinopneumonitisvirus immunisiert, das über 10-stündige Einwirkungszeit von 0,15%igem BPL inaktiviert worden war (Versuchsgruppen A und D, Abb. 2 und 3, Tab. 15 und 16), so bildeten von 18 der immunisierten Hamster 17 nur komplementbindende Antikörper, ein einziges Tier auch neutralisierende Antikörper, die aber lediglich zum Zeitpunkt der Blutentnahme am 11. Tag nach der Reimmunisierung nachweisbar waren (Titer 1 : 12). Die komplementbindenden Antikörper, die wir nach diesen Immunisierungen nachweisen konnten, erreichten bei einzelnen Hamstern Titer von 1 : 16, die durchschnittlichen Werte betrugen bei den Tieren der Gruppe D, bei denen die Immunisierung aus zwei Injektionen im Abstand von 26 Tagen und einer Reimmunisierung bestand, < 1 : 4 am 24. Tag nach abgeschlossener Grundimmunisierung und stiegen dann auf Durchschnittswerte von 1 : 13 am 11. Tag nach erfolgter Reimmunisierung an. Danach war ein kontinuierlicher Titerabfall zu beobachten. Die Hamster, deren Grundimmunisierung aus einer Injektion, gefolgt von Reimmunisierung am Tag 27 p.i. bestand (Gruppe A, Abb. 2), entwickelten ebenfalls lediglich komplementbindende Antikörper mit Maximaltitern von 1 : 16 am 19. Tag nach der Grundimmunisierung, der Durchschnittstiters bei dieser Tiergruppe betrug zu diesem Zeitpunkt 1 : 6. Durch Reimmunisierung konnte das kontinuierliche Absinken der komplementbindenden Antikörper auch hier nicht verhindert werden.

Alle Hamster, die wir ohne Adjuvanzzusatz mit Virus immunisiert hatten, das bei einer BPL-Endkonzentration von 0,15 % über 2 Stunden inaktiviert worden war und im Ausgangsmaterial einen bis um 0,75 log KID₅₀/ml höheren Infektiositätstiter aufwies als das in den Gruppen A und D verwendete Virus, entwickelten bereits zum 13. Tag nach abgeschlossener Grundimmunisierung neutralisierende Antikörper (Gruppe M, Abb. 5, Tab. 17, 18). Die Titermaxima einzelner Tiere betrugen zu diesem Zeitpunkt 1 : 12, der Gruppendurchschnitt 1 : 7. Durch Reimmunisierung wurde ein guter Boostereffekt erzielt, die Durchschnittstiter stiegen am 8. Tag nach der Reimmunisierung auf 1 : 16, in den Seren einzelner Tiere ließen sich neutralisierende Antikörper bis 1 : 48 nachweisen. Bis zum 27. Tag nach erfolgter Reimmunisierung war ein kontinuierlicher Titerabfall bis auf Durchschnittswerte von 1 : 7 nachweisbar.

Komplementbindende Antikörper konnten in dieser Tiergruppe M bereits am 13. Tag nach abgeschlossener Grundimmunisierung mit Durchschnittstitern von 1 : 46 nachgewiesen werden, die Antikörper von 50 % der immunisierten Tiere dieser Gruppe erreichten hierbei Titer von 1 : 64. Ob komplementbindende Antikörper bereits nach der ersten Injektion der Grundimmunisierung gebildet wurden, können wir nicht sagen, da aus technischen Gründen die Seren der immunisierten Tiere erst nach abgeschlossener Grundimmunisierung auf komplementbindende Antikörper untersucht worden waren. Zu diesem Zeitpunkt, am 13. Tag nach der 2. Injektion der Grundimmunisierung, hatten die komplement-

bindenden Antikörper bereits ihre höchsten Titer erreicht - der dann einsetzende Titerabfall war auch durch Reimmunisierung nicht mehr aufzuhalten.

Die von den Hamstern der bisher beschriebenen Versuchstiergruppe M nach Immunisierung mit BPL-inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus ohne Adjuvanzzusatz gebildeten neutralisierenden Antikörper erreichten durchschnittliche Werte, die über denen der Hamster lagen, die mit gleichem Antigen unter Zusatz von $\text{Al}(\text{OH})_3$ oder Mineralöl als Adjuvans (Gruppen K und L, Abb. 6, Tab. 17 und 18) immunisiert worden waren. Vergleicht man den Verlauf der Antikörperbildung bei diesen Tieren, so fällt auf, daß neutralisierende Antikörper nach Applikation von BPL-inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus und Öl-Adjuvans lediglich schneller gebildet wurden als nach Applikation des gleichen Antigens mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Zusatz. Neutralisierende Antikörper in den Seren der Tiere aus Gruppe L konnten wir bereits am 13. Tag nach der Grundimmunisierung mit Durchschnittstitern von 1 : 10 nachweisen, die 28 Tage später unter die Grenze der Nachweisbarkeit abgesunken waren. Die Tiere der Gruppe K hatten zu diesem Zeitpunkt noch keine neutralisierenden Antikörper gebildet. Nach der Reimmunisierung fanden wir einen steilen Titeranstieg in den Seren der Tiere, die Virus und $\text{Al}(\text{OH})_3$ erhalten hatten und einen weniger steilen und zeitlich verzögerten bei den Hamstern, die unter Verwendung von Mineralöl als Adjuvans immunisiert worden waren. Letztlich glichen sich die Durch-

schnittstiter bei beiden Versuchstiergruppen am 19. Tag nach erfolgter Reimmunisierung mit 1 : 10 bzw. 1 : 11.

Die Verwendung von Adjuvantien bei der Immunisierung der Hamster mit BPL-inaktiviertem Virus hatte einen starken stimulierenden Einfluß auf die Bildung komplementbindender Antikörper. Zum gleichen Zeitpunkt wie bei Gruppe M fanden wir in den Seren der Hamster aus Vergleichsgruppe K, die mit Virus und $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Zusatz immunisiert worden waren, maximale Titer von 1 : 256 und durchschnittliche Titer von 1:176. Bei Verwendung von Mineralöl (Gruppe L) als Adjuvans betrugen die analogen Werte 1 : 256 und 1 : 140. Die Bildung von komplementbindenden Antikörpern setzte auch hier früher ein als die der neutralisierenden Antikörper, vor allem wurden sofort nach abgeschlossener Grundimmunisierung höchste Titer erreicht, die aber im Verlauf von weiteren 50 Tagen über die Reimmunisierung hinaus kontinuierlich absanken. Die Durchschnittstiter der Tiere der Hamstergruppe K betrugen zu diesem Zeitpunkt 1 : 96, die der Gruppe L 1 : 64 (6. Entnahme). Die Verwendung von Hefe als Adjuvans hatte keinerlei Wirkung auf die Bildung von Antikörpern, die bei den Tieren der Gruppe E gebildeten komplementbindenden Antikörper waren erst nach der Reimmunisierung mit Zusatz von komplettem Freundschens Adjuvans nachweisbar.

VERSUCHS- TIER- GRUPPE	HAMSTER NR.	1.ENTNAHME 26 n. G ₁		2.ENTNAHME 50 n. G ₁ =24 n. G ₂		3.ENTNAHME 61 n. G ₁ =35 n. G ₂ =11 n. R ²		4.ENTNAHME 70 n. G ₁ =44 n. G ₂ =20 n. R ²	
		N-AK	KB-AK	N-AK		N-AK	KB-AK	N-AK	KB-AK
D	1	} <1 : 4	1 : 4	} <1 : 4	<1 : 4	1 : 16	} <1 : 4	<1 : 4	
	2		1 : 4		1 : 4	1 : 16		1 : 8	
	3		n.t.		-	n.t.		-	
	4		<1 : 4		<1 : 4	1 : 16		1 : 8	
	5		<1 : 4		1 : 12	n.t.		1 : 4	
	6		<1 : 4		<1 : 4	1 : 8		1 : 4	
	7		1 : 4		<1 : 4	1 : 8		1 : 8	
	8		n.t.		<1 : 4	n.t.		-	
	9		1 : 4		<1 : 4	1 : 16		1 : 8	
E	10	} <1 : 4	n.t.	} <1 : 4	<1 : 4	n.t.	} <1 : 4	-	
	11		1 : 8		1 : 7	1 : 8		1 : 4	
	12		n.t.		-	-		-	
	13		n.t.		<1 : 4	n.t.		-	
	14		1 : 8		1 : 20	1 : 128		1 : 12	
	15		n.t.		-	n.t.		-	
	16		1 : 4		<1 : 4	1 : 32		<1 : 4	
	17		1 : 4		<1 : 4	1 : 32		<1 : 4	

N-AK : Titer neutralisierender Antikörper

KB-AK : Titer komplementbindender Antikörper

n.t. : nicht getestet

n. G₁ = Tage nach der 1. Injektion der Grundimmunisierung

n. G₂ = Tage nach der 2. Injektion der Grundimmunisierung

n. R = Tage nach Reimmunisierung

n. Ch = Tage nach Challenge - Infektion

TABELLE 15: BILDUNG VON KOMPLEMENTBINDENDEN UND NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPERN NACH
IMMUNISIERUNG VON HAMSTERN MIT BPL-INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS

VERSUCHS- TIER- GRUPPE	1. ENTNAHME 26 n. G ₁		2. ENTNAHME 50 n. G ₁ =24 n. G ₂		3. ENTNAHME 61 n. G ₁ =35 n. G ₂ =11 n. R ²		4. ENTNAHME 70 n. G ₁ =44 n. G ₂ =20 n. R ²	
	N-AK	KB-AK	N-AK	N-AK	KB-AK	N-AK	KB-AK	
D	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	1 : 13	< 1 : 4	1 : 6	
E	< 1 : 4	1 : 6	< 1 : 4	1 : 5	1 : 50	1 : 4	1 : 38	

N-AK : Titer neutralisierender Antikörper

n. G₁ / G₂ / R : siehe Tabelle 75

KB-AK : Titer komplementbindender Antikörper

TABELLE 76: TITER KOMPLEMENTBINDENDER UND NEUTRALISIERENDER ANTIKÖRPER (DURCHSCHNITTSWERTE)

NACH IMMUNISIERUNG VON HAMSTERN MIT BPL-INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS
OHNE ADJUVANSZUSATZ (GRUPPE D) UND MIT ADJUVANSZUSATZ (GRUPPE E)

VERSUCHS- TIER- GRUPPE	HAMSTER NR.	1. ENTN.		2. ENTNAHME		3. ENTN.		4. ENTN.		5. ENTN.		6. ENTNAHME		7. ENTN.		8. ENTNAHME	
		16 n. G ₁		29 n. G ₁ = 13 n. G ₂		43 n. G ₁ = 27 n. G ₂		57 n. G ₁ = 41 n. G ₂		65 n. G ₁ = 49 n. G ₂ = 8 n. R		76 n. G ₁ = 60 n. G ₂ = 19 n. R		84 n. G ₁ = 68 n. G ₂ = 27 n. R		126 n. G ₁ = 110 n. G ₂ = 69 n. R = 22 n. Ch	
		N-AK		N-AK	KB-AK	N-AK		N-AK		N-AK		N-AK	KB-AK	N-AK		N-AK	KB-AK
K	18	<1 : 4	}	<1 : 4	1 : 256	n.t.	<1 : 4	<1 : 4	<1 : 4	1 : 6	1 : 64	1 : 4	1 : 7	1 : 32	<1 : 4	1 : 40	1 : 64
	19			1 : 10	1 : 256	1 : 4		1 : 64		1 : 32	1 : 64	1 : 48	1 : 40	1 : 64		1 : 20	1 : 64
	20			<1 : 4	1 : 64	n.t.		n.t.		1 : 8	1 : 128	<1 : 4	1 : 16	1 : 128		1 : 8	1 : 32
	21			<1 : 4	1 : 64	n.t.		n.t.		1 : 40	1 : 32	1 : 128	1 : 16	1 : 128		1 : 12	1 : 64
	22			1 : 4	n.t.	<1 : 4		n.t.		1 : 8	n.t.	1 : 10	-	-		1 : 24	1 : 32
	23			<1 : 4	1 : 256	<1 : 4		n.t.		<1 : 4	1 : 64	1 : 5	1 : 8	1 : 32		1 : 16	1 : 64
	24			<1 : 4	1 : 128	<1 : 4		<1 : 4		<1 : 4	1 : 64	1 : 5	1 : 12	1 : 64		1 : 24	1 : 32
	25			<1 : 4	1 : 256	n.t.		1 : 7		1 : 8	1 : 128	1 : 12	1 : 24	1 : 64		1 : 12	1 : 64
	26			<1 : 4	1 : 128	n.t.		n.t.		1 : 4	1 : 128	<1 : 4	1 : 24	1 : 64		1 : 16	1 : 32
	27			<1 : 4	n.t.	n.t.		n.t.		-	-	-	-	-		1 : 16	1 : 32
L	28	<1 : 4	}	<1 : 4	n.t.	-	<1 : 4	-	<1 : 4	-	-	-	-	-	<1 : 4	1 : 28	1 : 32
	29			1 : 40	1 : 128	1 : 12		1 : 6		1 : 7	1 : 64	1 : 5	1 : 28	1 : 32		1 : 16	1 : 32
	30			<1 : 4	n.t.	<1 : 4		n.t.		-	-	-	-	-		1 : 12	1 : 64
	31			1 : 12	1 : 128	n.t.		<1 : 4		1 : 14	n.t.	1 : 6	1 : 56	1 : 32		1 : 16	1 : 32
	32			1 : 16	1 : 32	1 : 8		1 : 7		1 : 12	1 : 28	1 : 40	1 : 64	1 : 32		1 : 12	1 : 64
	33			<1 : 4	1 : 7	1 : 128		1 : 7		1 : 8	1 : 64	1 : 4	1 : 32	1 : 64		1 : 16	1 : 32
	34			1 : 4	1 : 256	n.t.		<1 : 4		1 : 8	1 : 128	1 : 7	1 : 16	1 : 32		1 : 12	1 : 64
	35			1 : 8	1 : 256	n.t.		<1 : 4		<1 : 4	1 : 64	<1 : 4	1 : 10	1 : 32		1 : 16	1 : 32
	36			<1 : 4	1 : 128	n.t.		<1 : 4		<1 : 4	1 : 32	<1 : 4	1 : 7	1 : 64		1 : 12	1 : 32
	37			1 : 14	1 : 64	n.t.		1 : 6		1 : 14	1 : 64	1 : 8	1 : 20	1 : 32		1 : 16	1 : 32
M	38	<1 : 4	}	1 : 10	1 : 64	<1 : 4	<1 : 4	n.t.	<1 : 4	1 : 6	1 : 10	1 : 16	1 : 6	1 : 32	<1 : 4	1 : 4	1 : 64
	39			<1 : 4	1 : 16	<1 : 4		n.t.		1 : 7	1 : 7	1 : 32	<1 : 4	1 : 4		1 : 12	1 : 64
	40			1 : 4	1 : 64	n.t.		<1 : 4		1 : 5	1 : 7	1 : 32	1 : 8	1 : 14		1 : 16	1 : 32
	41			1 : 6	1 : 32	<1 : 4		n.t.		1 : 7	1 : 7	1 : 32	1 : 7	1 : 12		1 : 12	1 : 64
	42			<1 : 4	n.t.	n.t.		<1 : 4		1 : 48	1 : 20	n.t.	-	-		1 : 16	1 : 32
	43			<1 : 4	1 : 32	n.t.		<1 : 4		1 : 10	1 : 20	1 : 64	1 : 8	1 : 14		1 : 12	1 : 64
	44			1 : 10	1 : 64	n.t.		<1 : 4		1 : 6	1 : 12	1 : 32	1 : 6	1 : 8		1 : 16	1 : 32
	45			1 : 12	1 : 64	<1 : 4		n.t.		1 : 5	1 : 5	1 : 16	1 : 7	1 : 12		1 : 12	1 : 64
	46			1 : 5	1 : 32	n.t.		<1 : 4		1 : 48	1 : 28	1 : 16	1 : 12	1 : 12		1 : 16	1 : 32

N-AK : Titer neutralisierender Antikörper

n.t. : nicht getestet

KB-AK: Titer komplementbindender Antikörper

n. G₁ / G₂ / R / Ch : siehe Tabelle 15

TABELLE 17: BILDUNG VON KOMPLEMENTBINDENDEN UND NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPERN NACH

IMMUNISIERUNG VON HAMSTERN MIT BPL-INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS

VERSUCHS- TIER- GRUPPE	1. ENTN.	2. ENTNAHME		3. ENTN.	4. ENTN.	5. ENTN.	6. ENTNAHME		7. ENTN.	8. ENTNAHME	
	16 n. G ₁ N-AK	29 n. G ₁ = 13 n. G ₂ h-AK KB-AK		43 n. G ₁ = 27 n. G ₂ h-AK	57 n. G ₁ = 41 n. G ₂ N-AK	65 n. G ₁ = 49 n. G ₂ = 8 n. R N-AK	76 n. G ₁ = 60 n. G ₂ = 19 n. R N-AK KB-AK		84 n. G ₁ = 68 n. G ₂ = 27 n. R N-AK	126 n. G ₁ = 110 n. G ₂ = 69 n. R ² = 22 n. Ch N-AK KB-AK	
K	< 1 : 4	< 1 : 4	1 : 176	< 1 : 4	< 1 : 4	1 : 13	1 : 11	1 : 96	1 : 11	1 : 20	1 : 64
L	< 1 : 4	1 : 10	1 : 140	1 : 7	< 1 : 4	1 : 4	1 : 10	1 : 64	1 : 9	1 : 29	1 : 68
M	< 1 : 4	1 : 7	1 : 46	< 1 : 4	< 1 : 4	1 : 16	1 : 13	1 : 30	1 : 7	1 : 11	1 : 17

N-AK : Titer neutralisierender Antikörper

n. G₁ / G₂ / R / Ch : siehe Tabelle 15

KB-AK : Titer komplementbindender Antikörper

TABELLE 18: TITER KOMPLEMENTBINDENDER UND NEUTRALISIERENDER ANTIKÖRPER (DURCHSCHNITTSWERTE)
NACH IMMUNISIERUNG VON HAMSTERN MIT BPL-INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS
UNTER ADJUVANSZUSATZ (GRUPPEN K UND L) UND MEDIUMZUSATZ (KONTROLLGRUPPE M)

3.2.5.3. AEI-inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus als Immunisierungsantigen

Acetyläthylenimin-inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus war in 7 Versuchstiergruppen an insgesamt 64 Hamstern hinsichtlich seiner Immunogenität geprüft worden.

Zur besseren Übersicht sind die verwendeten Immunisierungsantigene entsprechend der Zuordnung zu den einzelnen Immunisierungsgruppen in einer Tabelle nochmals aufgeführt:

Versuchstiergruppe	Testvirus Passagenzahl	Titer vor Inaktivierung ($-\log(KID_{50})/ml$)	AEI-Inaktivierung (16Std./+37°C) AEI-Endkonz.	Verwendung von Adjuvantien bei Immunisierung
B	RAC-H 10.ENS, 2.RK ₁₃	7,25	0,04 %	-
F	RAC-H 11.ENS	7,00	0,03 %	-
G				Adj.1 / Adj.2
H	RAC-H 269.ENS	7,25		-
N	RAC-H 14.ENS	7,75	0,03 %	Adj.3
O				Adj.4
P				-

Adj. (= Adjuvans) 1, 2, 3, 4 : siehe Tabelle 6

TABELLE 19 : AEI-INAKTIVIERTE RHINOPNEUMONITISANTIGENE, DIE ZUR IMMUNISIERUNG
EINGESETZT WURDEN

Verwendete Adjuvantien, Immunisierungspläne und Zeitpunkt der Blutentnahmen in Zugehörigkeit zu den einzelnen Immunisierungsgruppen sind der Tabelle 5 im Kapitel Material und Methoden zu entnehmen.

Die Ergebnisse der Serumuntersuchungen nach Immunisierung der Gruppe B sind in der Abbildung 2 aufgeführt.

Die Ergebnisse der Einzelserumuntersuchungen nach Immunisierung der Gruppen F, G, H, N, O und P sind aus den Tabellen 20, 21, 22 und 23 und den Abbildungen 3, 4, 5 und 6 ersichtlich.

Auf eine Immunisierung mit Rhinopneumonitisvirus, das mit 0,04 % AEI bei + 37°C über 16 Stunden inaktiviert worden war und ohne Zusatz von Adjuvans appliziert wurde, sprachen die Hamster zunächst mit der Bildung von komplementbindenden Antikörpern an, die am 8. Tag p.vacc. bereits Titer von 1 : 32 erreichten (Gruppe B, Abb. 2). Am 19. Tag p.vacc. waren diese Antikörper wieder weitgehend abgebaut, die Reimmunisierung bewirkte einen erneuten Anstieg der Antikörper, der sich bis zum 20. Tag nach erfolgter Reimmunisierung verfolgen ließ. Die nach Grundimmunisierung gebildeten Antikörperspiegel wurden durch die Reimmunisierung nicht mehr gesteigert. Auch in der Immunisierungsgruppe F (Abb. 3, Tab. 20, 21) konnten wir am 26. Tag nach der ersten Injektion der Grundimmunisierung keine komplementbindenden Antikörper nachweisen, dieser Entnahmetermin ist vergleichbar dem der Gruppe B am 19. Tag p.vacc. Nachdem wir in Gruppe F vorher keine Untersuchungen auf komplementbindende

Antikörper durchführen konnten, ist ein Vergleich des Immunisierungserfolges zu dem der Gruppe B nur insofern gestattet, als wir annehmen können, daß auch hier die komplementbindenden Antikörper zum Entnahmezeitpunkt bereits wieder abgesunken waren. Auch bei den Tieren dieser Immunisierungsgruppe hatte die Revakzination einen Boostereffekt zur Folge, die komplementbindenden Antikörper stiegen bis auf Durchschnittswerte von 1 : 20 an, Titermaxima einzelner Hamster lagen bei 1 : 32.

Ganz offensichtlich wirkte sich bei den beiden hier besprochenen Versuchstiergruppen der unterschiedliche Immunisierungszeitplan aus. Gruppe B war nach einmaliger Grundimmunisierung am 27. Tag p.vacc. revakziniert worden, Gruppe F hatte in 26-tägigem Abstand zwei Injektionen als Grundimmunisierung, gefolgt von Reimmunisierung nach weiteren 24 Tagen erhalten. Während wir bei Gruppe B einen kontinuierlichen Anstieg der komplementbindenden Antikörper nach der Reimmunisierung beobachten konnten, fanden wir bei den Tieren der Gruppe F zum Zeitpunkt der ersten Serumuntersuchung nach der Revakzination zwar ebenfalls hohe Titer von komplementbindenden Antikörpern, konnten jedoch dann einen schnellen Titerabfall registrieren. Eine Aussage über den Antikörpergehalt der Seren dieser Tiere nach der zweiten Injektion der Grundimmunisierung - die der Reimmunisierung der anderen Gruppen entspräche - ist uns nicht möglich, da die geringen Serummengen, die man über Herzpunktion bei Hamstern erhalten kann, hier nicht mehr die Untersuchung im Neutralisationstest und in der Komplementbin-

dungsreaktion zuließen.

In den Seren der Tiere beider Versuchsgruppen konnten wir erst nach erfolgter Reimmunisierung neutralisierende Antikörper nachweisen. Die Antikörpertiter der Hamster der Gruppe B lagen zum Zeitpunkt der Blutentnahme am 7. Tag nach der Reimmunisierung hierbei über denen der Gruppe F am 11. Tag nach der Reimmunisierung. Bei den Hamstern der Immunisierungsgruppe B persistierten diese Antikörper bis zum 20. Tag nach Reimmunisierung, in den Seren der Versuchsgruppe F gelang der Nachweis neutralisierender Antikörper zum gleichen Zeitpunkt nur noch bei einem Tier (Titer: 1 : 4).

Den Einfluß der verwendeten Virusdosis auf den Immunisierungserfolg erkennen wir an den Ergebnissen der serologischen Untersuchungen der Hamstergruppe P (Abb. 5, Tab. 22, 23); diese Gruppe war mit AEI-inaktiviertem Virus immunisiert worden, dessen Ausgangstiter mit $10^{7,75} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ um 0,5 bzw. 0,75 log $\text{KID}_{50}/\text{ml}$ (= um 81 % bzw. 70 % höhere Partikelzahl) über dem des in den Versuchstiergruppen B und F zur Immunisierung verwendeten Antigens lag. Hier induzierte bereits die Grundimmunisierung, die aus zwei im Abstand von 16 Tagen erfolgten Injektionen bestand, die Bildung von neutralisierenden Antikörpern mit durchschnittlichen Titern von 1 : 5. Die Reimmunisierung hatte hier einen steilen Antikörperanstieg zur Folge, die durchschnittlichen Titer der neutralisierenden Antikörper am 8. Tag nach der Reimmunisierung betrugen 1 : 16, am 19. Tag 1 : 18 und sanken bis zum Zeitpunkt der

Challenge-Infektion auf 1 : 11 ab. Die jeweiligen Titermaxima, die bei einzelnen Hamstern erreicht wurden, betrugen 1 : 56 bzw. 1 : 80. Alle immunisierten Hamster dieser Gruppe bildeten neutralisierende Antikörper.

Auch die Bildung von komplementbindenden Antikörpern war nach Immunisierung mit hochtitrigem AEI-inaktiviertem Virus besser als bei den anderen Tiergruppen. Wir fanden komplementbindende Antikörper mit durchschnittlichen Titern von 1 : 50 bereits am 13. Tag nach abgeschlossener Grundimmunisierung. Das Phänomen, daß die Reimmunisierung auf den schnell einsetzenden Titerabfall keinen Einfluß mehr hat, ließ sich auch hier beobachten; am 19. Tag nach der Reimmunisierung lag der Durchschnittswert der komplementbindenden Antikörper bei 1 : 36.

Vergleichbar den bei den Immunisierungsversuchen mit BPL-inaktiviertem Virus erhaltenen serologischen Ergebnissen hatte die Verwendung von AEI-inaktiviertem Virus mit $Al(OH)_3$ (Gruppe N), Mineralöl (Gruppe O) (Abb. 6, Tab. 22 , 23) bzw. Hefe (Gruppe G) (Abb. 4, Tab. 20, 21) als Adjuvans lediglich die Bildung komplementbindender Antikörper mit höheren Titern zur Folge als die Verwendung von adjuvansfreiem Immunisierungsantigen. Die Bildung neutralisierender Antikörper nach Applikation von AEI-inaktiviertem Virus mit Mineralölzusatz war zeitlich gegenüber der Kontrollgruppe P verzögert, die gebildeten Antikörper erreichten nicht die Titer der Tiere in dieser Immunisierungsgruppe. Die Titer der neutralisierenden Antikörper, die nach Immunisie-

rung mit AEI-inaktiviertem Virus und Verwendung von Öl oder $\text{Al}(\text{OH})_3$ als Adjuvans gebildet wurden, differierten nur geringfügig. Bei Verwendung von Mineralöl als Adjuvans waren neutralisierende Antikörper mit Durchschnittstitern von 1 : 8 am 27. Tag nach der Reimmunisierung nachweisbar, bei Verwendung von $\text{Al}(\text{OH})_3$ als Adjuvans wurde zum gleichen Zeitpunkt ein durchschnittlicher Titer von 1 : 6 erreicht. Anders sind die Verhältnisse bezüglich Bildung von komplementbildenden Antikörpern. Auf die Bildung von Antikörpern dieser Globulinklasse hatte die Verwendung von Adjuvantien, wie schon angeführt, einen deutlich steigenden Effekt. 13 Tage nach der 2. Injektion der Grundimmunisierung fanden wir komplementbindende Antikörper, die in den Seren der Hamster aus Gruppe N ($\text{Al}(\text{OH})_3$) Durchschnittstiter von 1 : 248 und in den Seren der Hamster der Gruppe O (Mineralöl) 1 : 154 erreichten. Die bei einzelnen Tieren erreichten maximalen Titer lagen bei 1 : 512 bzw. 1 : 256. Durch Reimmunisierung war der darauf einsetzende Titerabfall auch hier nicht aufzuhalten, er war bei den Hamstern, die Virus mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ als Adjuvans appliziert bekamen, wesentlich stärker ausgeprägt als bei der Verwendung von Mineralöladjuvans. Am 19. Tag nach der Reimmunisierung fanden wir bei den Hamstern der Gruppe N komplementbindende Antikörper mit Durchschnittstitern von 1 : 44, die damit etwa den Titern entsprachen, die die Hamster nach Immunisierung mit dem gleichen Antigen ohne Adjuvanzusatz zum gleichen Zeitpunkt aufwiesen, während die Durchschnittstiter der Hamster aus Gruppe O lediglich auf 1 : 128 abgesunken war.

VERSUCHS - TIER - GRUPPE	HAMSTER Nr.	1. ENTNAHME 26 n. G ₁		2. ENTNAHME 50 n. G ₁ = 24 n. G ₂		3. ENTNAHME 61 n. G ₁ = 35 n. G ₂ = 11 n. R ²		4. ENTNAHME 70 n. G ₁ = 44 n. G ₂ = 20 n. R ²	
		N-AK	KB-AK	N-AK	N-AK	KB-AK	N-AK	KB-AK	
F	47	} < 1 : 4	< 1 : 4	} < 1 : 4	< 1 : 4	1 : 4	< 1 : 4	1 : 16	
	48		1 : 4		< 1 : 4	1 : 32	< 1 : 4	1 : 32	
	49		1 : 4		1 : 6	1 : 32	< 1 : 4	1 : 16	
	50		< 1 : 4		1 : 8	1 : 16	< 1 : 4	1 : 8	
	51		1 : 8		1 : 6	1 : 32	n.t.	1 : 16	
	52		1 : 8		1 : 7	1 : 16	< 1 : 4	1 : 16	
	53		1 : 8		1 : 10	1 : 8	1 : 4	1 : 8	
B	72	} < 1 : 4	1 : 8	} < 1 : 4	1 : 6	n.t.	} < 1 : 4	1 : 16	
	73		1 : 4		1 : 8	1 : 128		1 : 64	
	74		< 1 : 4		1 : 4	1 : 32		1 : 16	
	75		< 1 : 4		1 : 4	1 : 32		1 : 16	
	76		< 1 : 4		< 1 : 4	1 : 32		1 : 32	
	77		< 1 : 4		1 : 12	1 : 16		1 : 4	
	78		< 1 : 4		< 1 : 4	1 : 16		1 : 32	
	79		< 1 : 4		1 : 7	1 : 64		1 : 32	
	80		1 : 8		< 1 : 4	n.t.		n.t.	
C	61	} < 1 : 4	} n.t.	} < 1 : 4	< 1 : 4	} n.t.	< 1 : 4	} n.t.	
	62				1 : 32		-		
	63				< 1 : 4		< 1 : 4		
	64				1 : 4		-		
	65				-		-		
	66				-		-		
	67				1 : 8		1 : 8		
	68				< 1 : 4		< 1 : 4		
	69				< 1 : 4		< 1 : 4		
	70				1 : 14		1 : 5		

N-AK : Titer neutralisierender Antikörper

n.t. : nicht getestet

KB-AK : Titer komplementbindender Antikörper

n. G₁ / G₂ / R / Ch : siehe Tabelle 75

TABELLE 22: SICUNG VON KOMPLEMENTBINDENDEN UND NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPERN NACH

IMMUNISIERUNG VON HAMSTERN MIT AEI-INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS

VERSUCHS- TIER- GRUPPE	<u>1.ENTNAHME</u> 26 n. G ₁		<u>2.ENTNAHME</u> 50 n. G ₁ =24 n. G ₂		<u>3.ENTNAHME</u> 61 n. G ₁ =35 n. G ₂ =11 n. R		<u>4.ENTNAHME</u> 70 n. G ₁ =44 n. G ₂ =20 n. R	
	N-AK	KB-AK	N-AK	N-AK	KB-AK	N-AK	KB-AK	
F	< 1 : 4	1 : 5	< 1 : 4	1 : 5	1 : 20	< 1 : 4	1 : 16	
G	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	1 : 5	1 : 46	< 1 : 4	1 : 27	
H	< 1 : 4	not.	< 1 : 4	1 : 5	not.	< 1 : 4	not.	

N-AK : Titer neutralisierender Antikörper

n. G₁ / G₂ / R : siehe Tabelle 15

KB-AK : Titer komplementbindender Antikörper

not. : nicht getestet

TABELLE 21: TITER KOMPLEMENTBINDENDER UND NEUTRALISIERENDER ANTIKÖRPER (DURCHSCHNITTSWERTE)
NACH IMMUNISIERUNG VON HAMSTERN MIT AEI-INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS
OHNE ADJUVANSZUSATZ (GRUPPEN F UND H) UND MIT ADJUVANSZUSATZ (GRUPPE G)

VERSUCHS- TIER- GRUPPE	HAMSTER NR.	1. ENTN.	2. ENTNAHME		3. ENTN.	4. ENTN.	5. ENTN.	6. ENTNAHME		7. ENTN.	8. ENTNAHME	
		16 n. G ₁	29 n. G ₁ = 13 n. G ₂		43 n. G ₁ = 27 n. G ₂	57 n. G ₁ = 41 n. G ₂	85 n. G ₁ = 49 n. G ₂ = 8 n. R ²	76 n. G ₁ = 60 n. G ₂ = 19 n. R ²		84 n. G ₁ = 68 n. G ₂ = 27 n. R ²	106 n. G ₁ = 110 n. G ₂ = 69 n. R ² = 22 n. Ch	
		N-AK	N-AK	KB-AK	N-AK	N-AK	N-AK	N-AK	KB-AK	N-AK	N-AK	KB-AK
N	73		<1 : 4	1 : 32	n.t.	<1 : 4	<1 : 4	1 : 4	1 : 32	<1 : 4	1 : 40	1 : 64
	74		<1 : 4	1 : 512	n.t.	<1 : 4	<1 : 4	1 : 10	>1 : 32	1 : 16	1 : 14	1 : 128
	75		1 : 4	1 : 512	1 : 4	<1 : 4	<1 : 4	1 : 7	1 : 128	1 : 8	1 : 28	1 : 64
	76		<1 : 4	1 : 256	n.t.	n.t.	<1 : 4	<1 : 4	1 : 32	<1 : 4	1 : 8	1 : 32
	77	<1 : 4	<1 : 4	n.t.	n.t.	n.t.	<1 : 4	<1 : 4	n.t.	-	-	-
	78		<1 : 4	1 : 128	<1 : 4	n.t.	<1 : 4	1 : 4	1 : 32	1 : 8	<1 : 4	1 : 32
	79		<1 : 4	1 : 256	<1 : 4	n.t.	<1 : 4	<1 : 4	1 : 32	<1 : 4	1 : 10	1 : 64
	80		<1 : 4	n.t.	n.t.	n.t.	<1 : 4	1 : 5	n.t.	1 : 6	-	-
	81		<1 : 4	>1 : 32	n.t.	n.t.	1 : 4	1 : 8	1 : 32	1 : 6	1 : 14	1 : 32
	82		<1 : 4	1 : 256	n.t.	n.t.	1 : 10	1 : 7	>1 : 32	1 : 10	1 : 8	1 : 16
O	83		<1 : 4	1 : 64	n.t.	<1 : 4	1 : 8	1 : 8	1 : 128	1 : 5	1 : 16	1 : 256
	84		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	85		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	86		<1 : 4	1 : 256	<1 : 4	1 : 4	<1 : 4	1 : 14	1 : 64	1 : 7	1 : 16	1 : 128
	87	<1 : 4	<1 : 4	1 : 256	n.t.	n.t.	<1 : 4	<1 : 4	1 : 64	1 : 7	1 : 10	1 : 128
	88		<1 : 4	n.t.	n.t.	n.t.	1 : 4	1 : 4	n.t.	1 : 8	-	-
	89		<1 : 4	1 : 64	<1 : 4	n.t.	<1 : 4	<1 : 4	1 : 256	1 : 8	1 : 56	1 : 128
	90		<1 : 4	n.t.	n.t.	<1 : 4	1 : 10	1 : 22	n.t.	1 : 22	-	-
	91		1 : 7	n.t.	n.t.	n.t.	-	-	-	-	-	-
	92		<1 : 4	1 : 128	<1 : 4	n.t.	<1 : 4	<1 : 4	1 : 128	1 : 4	1 : 5	1 : 256
P	93		1 : 8	n.t.	<1 : 4	n.t.	-	-	-	-	-	-
	94		<1 : 4	1 : 32	n.t.	n.t.	1 : 6	1 : 8	1 : 32	1 : 10	1 : 6	1 : 16
	95		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	96		1 : 14	1 : 32	n.t.	1 : 4	1 : 32	1 : 80	1 : 32	1 : 28	1 : 28	1 : 16
	97	<1 : 4	1 : 6	1 : 32	<1 : 4	n.t.	1 : 8	1 : 5	1 : 32	1 : 8	1 : 16	1 : 32
	98		<1 : 4	1 : 16	<1 : 4	n.t.	1 : 5	1 : 5	1 : 32	1 : 8	1 : 14	1 : 32
	99		<1 : 4	1 : 32	n.t.	n.t.	1 : 5	1 : 8	1 : 32	<1 : 4	1 : 8	1 : 32
	100		1 : 5	1 : 64	n.t.	1 : 6	1 : 4	1 : 8	1 : 64	1 : 5	1 : 16	1 : 16
	101		<1 : 4	1 : 64	n.t.	<1 : 4	1 : 56	1 : 28	1 : 32	1 : 24	>1 : 24	1 : 32
	102		1 : 10	1 : 128	1 : 4	<1 : 4	1 : 8	1 : 4	1 : 32	1 : 8	1 : 8	1 : 8

N-AK : Titer neutralisierender Antikörper

n.t. : nicht getestet

KB-AK : Titer komplementbindender Antikörper

n. G₁ / G₂ / R / Ch : siehe Tabelle 15

TABELLE 22: BILDUNG VON KOMPLEMENTBINDENDEN UND NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPERN NACH
IMMUNISIERUNG VON HAMSTERN MIT AEI-INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS

VERSUCHS- TIER- GRUPPE	1.ENTN.	2.ENTNAHME		3.ENTN.	4.ENTN.	5.ENTN.	6.ENTNAHME		7.ENTN.	8.ENTNAHME	
	16 n. G ₁ N-AK	29 n. G ₁ =15 n. G ₂ N-AK KB-AK		43 n. G ₁ =27 n. G ₂ N-AK	57 n. G ₁ =41 n. G ₂ N-AK	65 n. G ₁ =49 n. G ₂ = 8 n. R ² N-AK	76 n. G ₁ =60 n. G ₂ =19 n. R ² N-AK KB-AK		84 n. G ₁ =68 n. G ₂ =27 n. R ² N-AK	126 n. G ₁ =110 n. G ₂ = 69 n. R ² = 22 n. Ch N-AK KB-AK	
N	<1 : 4	<1 : 4	1 : 248	<1 : 4	<1 : 4	<1 : 4	1 : 5	1 : 44	1 : 6	1 : 15	1 : 54
O	<1 : 4	<1 : 4	1 : 154	<1 : 4	<1 : 4	<1 : 4	1 : 7	1 : 128	1 : 8	1 : 20	1 : 179
P	<1 : 4	1 : 5	1 : 50	<1 : 4	<1 : 4	1 : 16	1 : 18	1 : 36	1 : 11	1 : 15	1 : 23

N-AK : Titer neutralisierender Antikörper

n. G₁ / G₂ / R / Ch : siehe Tabelle 15

KB-AK : Titer komplementbindender Antikörper

TABELLE 23: TITER KOMPLEMENTBINDENDER UND NEUTRALISIERENDER ANTIKÖRPER (DURCHSCHNITTSWERTE)
NACH IMMUNISIERUNG VON HAMSTERN MIT AEI-INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS
UNTER ADJUVANSZUSATZ (GRUPPEN N UND O) UND MEDIUMZUSATZ (KONTROLLGRUPPE P)

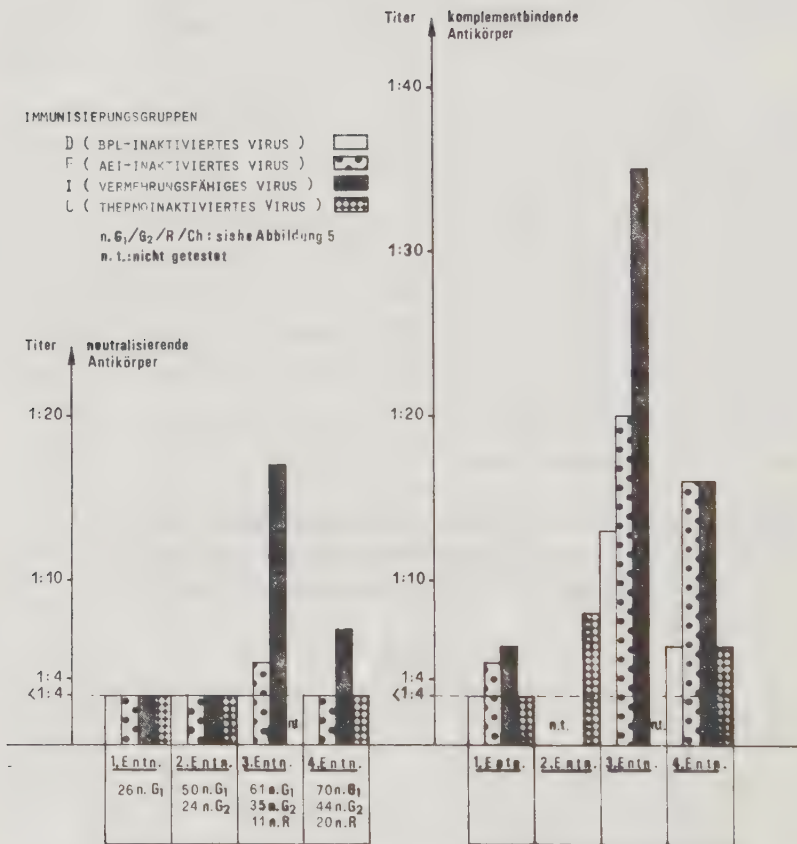


ABB. 3 . BILDUNG VON KOMPLEMENTBINDENDEN UND NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPERN
(DURCHSCHNITTSTITER) BEI HAMSTERN NACH IMMUNISIERUNG MIT INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS (GRUPPEN C, D UND F) UND VERMEHRUNGSFÄHIGEM RHINOPNEUMONITISVIRUS (GRUPPE I)

. GRUPPEN D, F, I : AUSGANGSTITER DES VERWENDETEN VIRUSMATERIALS : $10^{7,00}$ KID₅₀/ml)
(GRUPPE I : AUSGANGSTITER DES VERWENDETEN VIRUSMATERIALS : $10^{7,25}$ KID₅₀/ml)

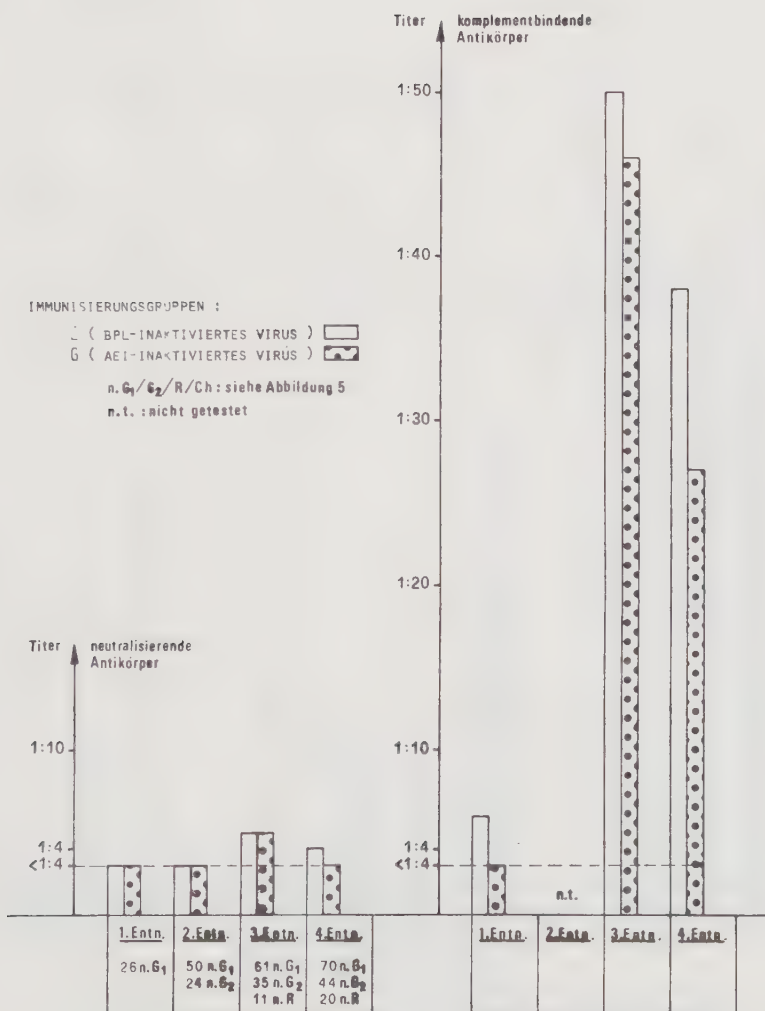


ABB. 4 : BILDUNG VON KOMPLEMENTBINDENDEN UND NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPERN (DURCHSCHNITTSTITER) BEI HAMSTERN NACH IMMUNISIERUNG MIT INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS MIT SACCHAROMYCES BOULARDII UND KOMPLETTEM FREUNDSCHEM ADJUVANS ALS ZUSATZ (GRUPPEN E UND G ; AUSGANGSTITER DES VERWENDETEN VIRUSMATERIALS: $10^{7,0}$ KID₅₀/ml)

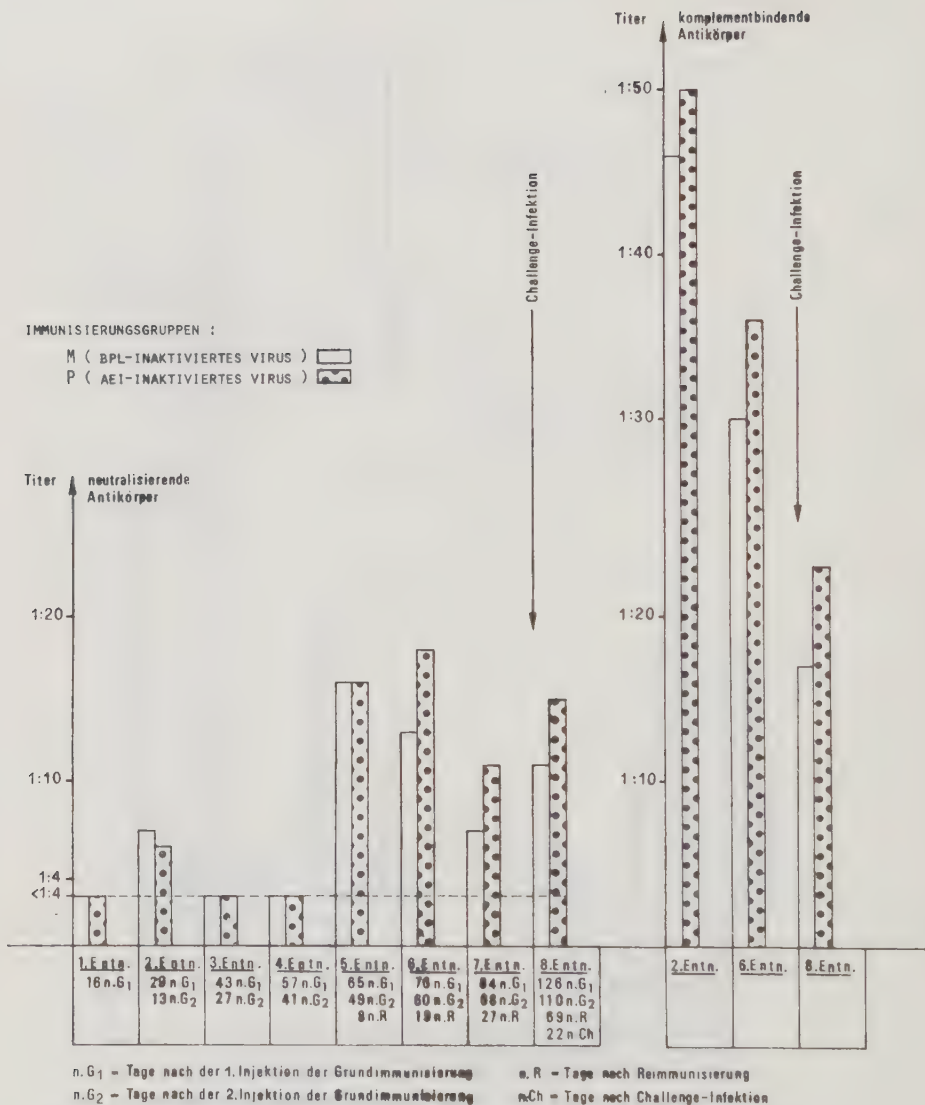
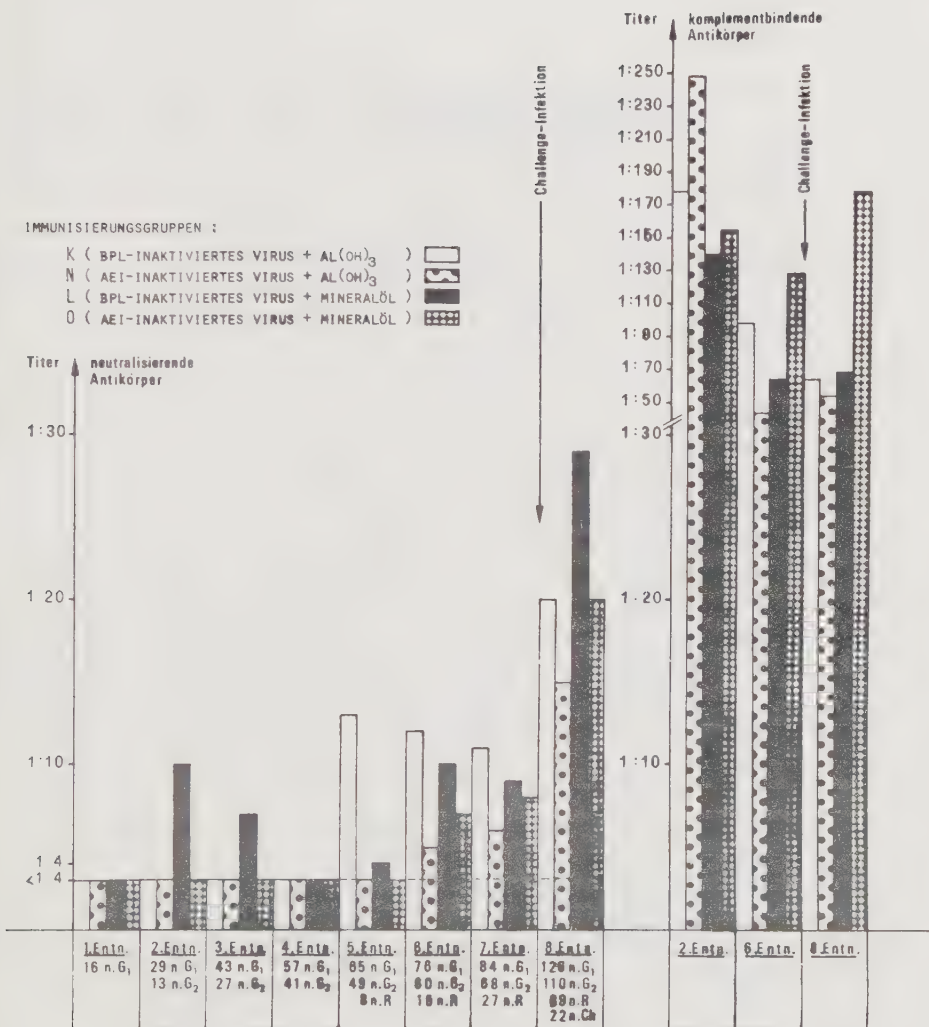


Abb. 5 : BILDUNG VON KOMPLEMENTBINDENDEN UND NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPERN (DURCHSCHNITTSTITER) BEI HAMSTERN NACH IMMUNISIERUNG MIT INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS OHNE ADJUVANSZUSATZ GRUPPEN M UND P ; AUSGANGSTITER DES VERWENDETEN VIRUSMATERIALS: $10^{7,75}$ KID₅₀/ml)



n. G₁/G₂/R/Ch: siehe Abbildung 5

ABB. 6 . BILDUNG VON KOMPLEMENTBINDENDEN UND NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPERN (DURCHSCHNITTSTITER) BEI HAMSTERN NACH IMMUNISIERUNG MIT INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS UND AL(OH)₃ ODER MINERALÖL ALS ADJUVANS (GRUPPEN K, L, N, O ; AUSGANGSTITER DES VERWENDETEN VIRUSMATERIALS : 10^{7,75} KID₅₀/ml)

3.2.5.4. Vermehrungsfähiges Rhinopneumonitisvirus
als Immunisierungsentigen

Nach Immunisierung von Hamstern mit vermehrungsfähigem Virus (Gruppe I) (Abb. 3, Tab. 24) wurden neutralisierende und komplementbindende Antikörper in stärkerem Maße gebildet als bei den Tieren der Versuchstiergruppen C, D, F und H, die Virus mit vergleichbarem Ausgangstiter nach Hitze-, AEI- und BPL-Inaktivierung ohne Adjuvans appliziert bekamen.

Neutralisierende Antikörper nach Immunisierung mit vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus waren erstmals am 11. Tag nach Reimmunisierung nachweisbar, der Durchschnittstiter in den Seren dieser Tiere lag bei 1 : 17, einzelne Hamster hatten Antikörper mit Titern von >1 : 48 gebildet, allerdings waren nur bei 50 % der Tiere Antikörper nachweisbar. Zum gleichen Zeitpunkt fanden wir komplementbindende Antikörper mit Durchschnittstitern von 1 : 35, mit Maximaltitern von 1 : 64. Innerhalb von 9 Tagen fielen die Antikörperspiegel auf 1 : 7 bzw. 1 : 16 ab.

Auch in dieser Versuchstiergruppe hatte erst die Reimmunisierung zur Bildung neutralisierender Antikörper mit signifikanten Titern geführt; komplementbindende Antikörper waren zwar schon nach der Grundimmunisierung mit niedrigen Titern nachweisbar, wurden aber durch die Revakzination in ihrer Quantität gesteigert.

VERSUCHS- TIER- GRUPPE	HAMSTER NR.	1.ENTNAHME 26 n. G ₁		2.ENTNAHME 50 n. G ₁ =24 n. G ₂		3.ENTNAHME 61 n. G ₁ =35 n. G ₂ =11 n. R		4.ENTNAHME 70 n. G ₁ =44 n. G ₂ =20 n. R	
		N-AK	KB-AK	N-AK	N-AK	KB-AK	N-AK	KB-AK	
I	103	< 1 : 4	n.t.	-	-	-	-	-	-
	104	< 1 : 4	1 : 4	< 1 : 4	1 : 40	1 : 64	1 : 28	1 : 16	
	105	1 : 6	n.t.	1 : 7	> 1 : 48	n.t.	-	-	
	106	< 1 : 4	n.t.	< 1 : 4	-	-	-	-	
	107	< 1 : 4	n.t.	1 : 4	-	-	-	-	
	108	< 1 : 4	n.t.	< 1 : 4	-	-	-	-	
	109	< 1 : 4	1 : 16	1 : 4	1 : 16	1 : 64	1 : 5	1 : 32	
	110	< 1 : 4	1 : 4	1 : 4	< 1 : 4	1 : 32	< 1 : 4	1 : 16	
	111	< 1 : 4	1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	1 : 8	
	112	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	1 : 16	1 : 4	1 : 8	
Durchschnittstiter :		< 1 : 4	1 : 6	< 1 : 4	1 : 17	1 : 35	1 : 7	1 : 16	

N-AK : Titer neutralisierender Antikörper

n. G₁ / G₂ / R : siehe Tabelle 15

KB-AK : Titer komplementbindender Antikörper

n.t. : nicht getestet

TABELLE 24: BILDUNG VON KOMPLEMENTBINDENDEN UND NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPERN NACH
IMMUNISIERUNG VON HAMSTERN MIT VERMEHRUNGSFÄHIGEM RHINOPNEUMONITISVIRUS

3.2.3.5. Challenge-Infektion

Die Challenge-Infektion der immunisierten Goldhamster mit $10^{2,35} \text{LD}_{50}$ Rhinopneumonitisvirus, Stamm Army 183, war bei den Tieren der einzelnen Immunisierungsgruppen zur Prüfung der Belastbarkeit der im Gefolge der Immunisierung entwickelten Immunität in unterschiedlichem zeitlichen Abstand 28 Tage bis 47 Tage nach Reimmunisierung durchgeführt worden. Die Infektionsdosis hatte sich aus den Titrationsversuchen mit dem Stamm Army in erwachsenen Hamstern zur Ermittlung der Hamster- LD_{50} ergeben. Die Reaktion der immunisierten Tiere hatten wir klinisch über einen Zeitraum von 21 Tagen überwacht und bei den Hamstern der Versuchsgruppen A - C und K - P drei Wochen nach erfolgter Challenge-Infektion erneut die humoralen Antikörper getestet.

Die intraperitoneale Applikation von $10^{2,35}$ Hamster LD_{50} hatte bei nicht immunisierten, erwachsenen Kontrollhamstern 50%ige Mortalität zur Folge. Die Tiere starben 2 - 7 Tage p.i. Diese Ergebnisse gibt die Tabelle 27 wieder.

Von insgesamt 96 immunisierten Goldhamstern, die unter gleichen Bedingungen infiziert worden waren, erkrankten 7, Todesfälle traten nicht auf (s. Tabelle 26). Als typisches Anzeichen einer klinisch manifesten Infektion mit Rhinopneumonitisvirus werteten wir in diesem Versuch Freßunlust und verzögerte Reaktion auf Umweltreize (1+), Apathie und eingestellte Futteraufnahme (2+) und schließlich Ataxie, Nasenausfluß und Tränenfluß in Kombination mit den anderen Symptomen (3+).

Krankheitsanzeichen dieser Art konnten wir bei den postvakzinal infizierten Tieren zwischen den Tagen 1 und 8 p.i. beobachten.

Die nach der Challenge-Infektion beobachtete Erkrankungsrate war überraschend gering. Es erkrankten aus der Hamstergruppe G, die mit AEI-inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus und Hefe als Adjuvans immunisiert worden war, die meisten Tiere. Drei von 9 Hamstern dieser Gruppe zeigten schwere Symptome einer Erkrankung. Ein Hamster aus Gruppe D (niedrigtitriges Rhinopneumonitisvirus, BPL-inaktiviert, kein Adjuvans) erkrankte gleich schwer wie die drei Tiere aus Gruppe G.

Die restlichen drei spezifisch auf die Challenge-Infektion reagierenden Tiere sind jeweils den Immunisierungsgruppen F (niedrigtitriges Rhinopneumonitisvirus, AEI-inaktiviert, kein Adjuvans), L (hochtitriges Rhinopneumonitisvirus, BPL-inaktiviert, Öl-Adjuvans) und O (hochtitriges Rhinopneumonitisvirus, AEI-inaktiviert, Öl-Adjuvans) zuzuordnen. Diese Tiere erkrankten jedoch nicht so schwer.

Wenn wir die zum Zeitpunkt der Challenge-Infektion in den postinfektionell erkrankten Hamstern vorhandenen neutralisierenden Antikörper prüfen, so ergibt sich, daß wir entweder keine oder aber nur Antikörper mit Titern bis 1 : 4 nachweisen konnten. Komplementbindende Antikörper dagegen lagen zum gleichen Zeitpunkt bis zu einem Titer von 1 : 128 vor. Eine Übersicht darüber gibt die folgende Tabelle:

erkrankter Hamster Nr.	Versuchs- Gruppe	Titer humoraler Antikörper zum Zeitpunkt der Challenge-Infektion	
		neutralisierende Antikörper	komplementbindende Antikörper
57	G	< 1 : 4	1 : 16
61	G	< 1 : 4	1 : 32
62	G	< 1 : 4	n.t.
6	D	< 1 : 4	< 1 : 4
53	F	1 : 4	1 : 8
37	L	1 : 4	n.t.
92	O	1 : 4	128

Tabelle 25: Titer humoraler Antikörper der nach
Challenge-Infektion erkrankten Hamster

Ob dies ein zufälliges Zusammentreffen ist, können wir nicht beurteilen. Wir können lediglich feststellen, daß keiner der Hamster erkrankte, die nach Vakzination und zum Zeitpunkt der Challenge-Infektion neutralisierende Antikörper mit Titern $> 1 : 4$ gebildet hatten. Andererseits überstanden Hamster, die keine neutralisierenden Antikörper gebildet hatten, die Belastung reaktionslos. Eine Korrelation zwischen humoralen, neutralisierenden Antikörpern und Schutzwirkung läßt sich nicht herstellen.

Die Goldhamster, die mit AEI- oder BPL-inaktiviertem Virus ohne Adjuvanzzusatz immunisiert worden waren (Gruppen M und P), reagierten serologisch auf die Challenge-Infektion lediglich mit einem geringgradigen Ansteigen der neutralisierenden Antikörper, erreichten jedoch nicht mehr die nach Reimmunisierung nachgewiesenen Antikörperspiegel. Das "Sich-Ausschleichen" der komplementbindenden Antikörper wurde durch die Infektion nicht verhindert.

Anders reagierten die Tiere, die mit Vakzine und Adjuvanzzusatz immunisiert worden waren (Gruppen K, L, N und O). Auffallend stark sprachen die Hamster auf die Infektion an, die BPL-inaktiviertes Virus mit $Al(OH)_3$ - oder Mineralölszusatz erhalten hatten. Die Titer der neutralisierenden Antikörper dieser Tiere stiegen von durchschnittlich 1 : 11 bzw. 1 : 9 zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion auf 1 : 20 bzw. 1 : 29 drei Wochen p.i. Schwächer reagierten die Hamster, die AEI-inaktiviertes Virus mit Adjuvanzzusatz erhalten hatten, aber auch hier war der Booster-effekt der Challenge-Infektion so stark, daß die nach der Reimmunisierung erreichten Durchschnittstitel noch überschritten wurden.

Auch die Titer der komplementbindenden Antikörper in den Seren der Tiere der sog. "Adjuvansgruppen" stiegen nach der Challenge-Infektion geringgradig wieder an (Abb. 6).

Aus technischen Gründen hatten wir die letzte Untersuchung der Seren auf komplementbindende Antikörper am 19. Tag nach der Reimmunisierung durchgeführt, die auf neutralisierende Antikörper dagegen nochmals am 27. Tag nach der Reimmunisie-

rung. Die am 22. Tag nach der Challenge-Infektion nachgewiesenen Antikörper lassen also keine definitive Aussage über den Verlauf der Bildung von komplementbildenden Antikörpern zu, da uns die letzte Entnahme vor der Challenge-Infektion fehlt.

Immunisierungs- gruppe	Anzahl erkrankter / Anzahl belasteter Tiere	Itd. Nr. der erkrankten Hamster	Erkrankung am Tag post.								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0 / 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	0 / 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	0 / 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	1 / 7	6	+	++	++	++	++	++	+++	+	-
E	0 / 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	1 / 6	53	-	-	-	-	-	+	+	-	-
G	3 / 9	57	-	+++	+	-	-	-	-	-	-
		61	-	-	-	-	-	+	+++	+	-
		62	-	+++	+	-	-	-	-	-	-
H	0 / 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	0 / 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	0 / 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	1 / 8	37	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M	0 / 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	0 / 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O	1 / 5	92	-	+	+	-	-	-	-	-	-
P	0 / 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : Freunlust, verzögerte Reaktionen

++ : Apathie, struppiges Fell

+++ : Apathie, struppiges Fell, Ataxien, Nasenausfluß, Tränenfluß

TABELE 26 : ERGEBNISSE DER CHALLENGE-INFEXTION BEI IMMUNISIERTEN HAMSTERN

Als Kontrolle hatten wir parallel zu den Belastungsinfektionen der Gruppen A - C, D - I und K - P jeweils 12 erwachsene Hamster mit dem im Challengeversuch eingesetzten Virus infiziert. Das Ergebnis dieser Kontrollversuche ist in der Tabelle 27 zusammengestellt.

Infektion parallel zu den Immunisierungsgruppen	Anzahl toter Tiere/ Gesamtzahl infizierter Tiere	Anzahl toter Tiere am Tag p.i./ Gesamtzahl toter Tiere Tag p.i.....							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A - C	6/12	-	2/6	1/6	-	2/6	-	1/6	-
D - I	7/12	-	1/7	3/7	2/7	-	1/7	-	-
K - P	6/12	-	1/6	2/6	-	3/6	-	-	-

Tabelle 27: Übersicht über den Verlauf der Infektion von nichtimmunisierten Kontrollhamstern mit dem Challenge-Virus Army 183 (Titer: $10^{2,35} \text{LD}_{50}/\text{ml}$)

3.2.6. Immunisierung von Meerschweinchen

In orientierenden Versuchen untersuchten wir die Immunogenität von AEI-inaktiviertem sowie von vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus mit und ohne Adjuvans-Zusatz lediglich an insgesamt 9 erwachsenen Meerschweinchen.

Als Testvirus hatten wir den Stamm RAC-H in der 10. ENS-, 2. RK₁₃-Passage mit einem Titer von $10^{6,0}$ KID₅₀/ml verwendet.

Immunisierungsschema und Daten der Blutentnahmen sind dem Kapitel "Material und Methoden" zu entnehmen.

Wie aus der Tabelle 28 ersichtlich ist, entwickelten alle immunisierten Meerschweinchen sowohl komplementbindende als auch neutralisierende Antikörper. Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Antikörperbildung und der erreichten Titer bestand zwischen den einzelnen Meerschweinchengruppen kein Unterschied. Zum 18. Tag nach der 1. Injektion der Grundimmunisierung waren bei allen Tieren komplementbindende Antikörper mit Titern bis 1 : 64 nachweisbar. Neutralisierende Antikörper traten erst 16 Tage später - nach Abschluß der Grundimmunisierung - mit Maximaltitern von 1 : 6 auf; ausgenommen hiervon ist die Gruppe der Tiere, die vermehrungsfähiges Virus ohne Adjuvans erhalten hatte und keine Antikörper entwickelte. Die Reimmunisierung wirkte im allgemeinen nicht als Booster, die komplementbindenden Antikörper blieben unverändert, die Titer der neutralisierenden Antikörper stiegen bei einzelnen Tieren geringgradig bis auf Höchstwerte von 1 : 16 an. Den mit vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus

immunisierten Meerschweinchen waren unbehandelte Tiere zur Kontrolle der Virusausscheidung beige-
setzt worden. Die Kontrolltiere bildeten keine
Antikörper, so daß anzunehmen ist, daß von den
immunisierten Meerschweinchen kein Rhinopneu-
monitisvirus ausgeschieden wurde.

VERSUCHS- TIER- GRUPPE	MEERSCHW. NR.	1. ENTNAHME		2. ENTNAHME		3. ENTNAHME		4. ENTNAHME		5. ENTNAHME	
		-		7 n. G ₁		18 n. G ₁ = 11 n. G ₂		34 n. G ₁ = 27 n. G ₂ = 16 n. G ₃		48 n. G ₁ = 41 n. G ₂ = 30 n. G ₃ = 16 n. R ₃	
		N-AK	KB-AK	N-AK	KB-AK	N-AK	KB-AK	N-AK	KB-AK	N-AK	KB-AK
A	1	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	1 : 16	1 : 6	1 : 64	1 : 8	1 : 64
	2						1 : 16	1 : 6	1 : 64	1 : 5	1 : 64
	3						n.t.	1 : 6	1 : 32	< 1 : 4	1 : 64
B	4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	1 : 64	1 : 6	1 : 64	1 : 8	1 : 32
	5						1 : 16	1 : 4	1 : 32	< 1 : 4	1 : 32
	6						1 : 16	1 : 4	1 : 32	1 : 7	1 : 64
	K ₁	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4
C	7	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	1 : 16	< 1 : 4	1 : 64	-	-
	8						-		-	-	-
	9						1 : 64		1 : 64	1 : 16	1 : 32
	K ₂	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4

n. G₁ / G₂ / G₃ / R / Ch : siehe Tabelle 15

N-AK : Titer neutralisierender Antikörper

K_{1/2} : ungeimpfte Kontrolltiere

KB-AK : Titer komplementbindender Antikörper

n.t. : nicht getestet

TABELLE 28: BILDUNG VON KOMPLEMENTBINDENDEN UND NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPERN NACH
IMMUNISIERUNG VON MEERSCHWEINCHEN MIT AEI-INAKTIVIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS
OHNE ADJUVANS (GRUPPE A), VERMEHRUNGSFÄHIGEM VIRUS MIT ADJUVANS (GRUPPE B)
UND VERMEHRUNGSFÄHIGEM VIRUS OHNE ADJUVANS (GRUPPE C)

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Versuche, Herpesviren mit AEI zu inaktivieren, sind bisher nicht beschrieben. Bei der Inaktivierung von Putenherpesvirus (86) sowie von Ajeszkyvirus (184) wurde EEI als Inaktivierungsmittel erfolgreich eingesetzt.

EEI gehört ebenso wie AEI in die Gruppe der Äthylenimine (Akrylfarbstoffe) und verfügt über den gleichen Wirkungsmechanismus. Beide Inaktivierungsmittel haben ihren Angriffspunkt in der Nukleinsäure, die Virusinaktivierung verläuft als Reaktion 1. Ordnung (29, 62). Vor allem zur Inaktivierung von Maul- und Klauenseuche-Virus wurde AEI bisher erfolgreich eingesetzt (5, 62, 209).

In unseren Versuchen begannen wir zunächst mit AEI-Endkonzentrationen von 0,75 bis 0,066 % zu arbeiten und stellten fest, daß bei einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei + 37°C Rhinopneumonitisvirus spezifisch zu inaktivieren war. Die Infektiositätstiter der Temperaturkontrollen sanken während dieser Inkubationszeit lediglich um 0,25 log KID₅₀/ml.

Über weitere Verringerung der AEI-Endkonzentration hatten wir bei Verwendung von proteinfreiem Virusmedium die wirksame Minimalkonzentration von 0,03 % AEI bei einer Inkubation von 16 Stunden bei + 37°C erreicht. Nach Verkürzung der Inkubationsdauer auf 14 Stunden besaß das Virus noch eine Restinfektiosität von 0,75 log KID₅₀/ml. Weitere Reduzierung der Inkubationszeit hatte eine zunehmende Restinfektiosität

des Virus zur Folge.

Eine lineare Beziehung zwischen Einwirkungs-
dauer des Inaktivierungsmittels und Infektio-
sitätsverlust des Virus beobachteten auch
andere Autoren (29, 62) bei der Inaktivierung
von Maul- und Klauenseuche-Virus (MKS-Virus)
mit AEI.

Bei der AEI-Inaktivierung von Rhinopneumonitis-
virus in proteinhaltigem Erhaltungsmedium waren
- ebenso wie bei Verwendung von BPL - höhere
Konzentrationen des Inaktivierungsmittels für
die vollständige Virusinaktivierung notwendig.
SKODA und WITTMANN (184) benötigten zur Inakti-
vierung von Aujeszkyvirus eine EEI-Endkonzentra-
tion von 0,15 % bei gleichen Inkubationsbedin-
gungen (+ 37°C; 16 Stunden). Möglicherweise
hat dies seine Ursache darin, daß die Autoren
in den beschriebenen Versuchen Virus in kälber-
serumhaltigem Medium verwendeten und ein be-
stimmter Anteil des Inaktivierungsmittels durch
Reaktion mit dessen Proteinen unspezifisch ver-
braucht wurde.

Unsere Versuche haben ergeben, daß AEI ein ge-
eignetes Inaktivierungsmittel ist, um die In-
fektiosität von Rhinopneumonitisvirus zu zer-
stören.

Über erfolgreiche Versuche, Rhinopneumonitisvirus
durch BPL zu inaktivieren, berichteten DOLL u.M.
(56) sowie SHIMIZU u.M. (177, 178). Beide For-
schergruppen arbeiteten mit Rhinopneumonitis-
virus aus infizierten Hamsterlebern. DOLL u.M.
(56) hatten BPL in Endkonzentrationen von 0,1,
0,2, 0,3 und 0,4 % bei einer Einwirkungsdauer

von 70 - 90 Tagen bei + 4°C verwendet und prüften dann die Schutzwirkung des derart inaktivierten Rhinopneumonitisvirus im Vergleich zu formalin-inaktivierten Rhinopneumonitis-Vakzinen in Goldhamstern. Einzeldaten über den Inaktivierungsverlauf sind nicht angegeben.

Das gleiche gilt für die von SHIMIZU u.M. (177, 178) und KAWAKAMI u.M. (89) beschriebenen Versuche; hierbei wird lediglich angeführt, daß Fohlen und erwachsene Pferde mit BPL-inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus unter verschiedenen Bedingungen immunisiert wurden.

Die inaktivierende Wirkung des BPL beruht auf seiner Reaktion mit Hydroxyl-, Amino-, Carboxyl-, Sulfhydryl- und Phenolgruppen von Proteinen und damit auch der Virusnukleoproteine (110, 204).

Die Virusinaktivierung erfolgt rasch und ist irreversibel. Die Angaben über die für die Virusinaktivierung erforderliche BPL-Endkonzentration variieren zwischen 0,016 % und 0,5 % (204); bei Reaktionstemperaturen von + 4°C und + 37°C sind in der Literatur Einwirkungszeiten von 20 Minuten bis 90 Tagen beschrieben (204, 56). Derartige Angaben betreffen mit wenigen Ausnahmen Versuche zur BPL-Inaktivierung von Viren, die nicht in die Herpesgruppe gehören.

Auf Grund der Thermolabilität des Rhinopneumonitisvirus hatten wir zunächst versucht, die optimale BPL-Konzentration bei Inkubationstemperaturen von + 4°C und Raumtemperatur zu finden. Hierbei gelang es unter Verwendung von BPL-Endkonzentrationen von 0,0003, 0,03, 0,05 und 0,053 % bei Inkubationszeiten von 120 und 144 Stunden und anschließender 25-stündiger Lagerung bei + 4°C

nicht, Rhinopneumonitisvirus zu inaktivieren. Wurden diese Versuche bei + 37°C (BPL-Endkonzentration 0,0003 %) durchgeführt, so war lediglich ein Titerverlust erreichbar, der dem der parallel angesetzten Temperaturkontrolle entsprach. Dies betraf die Versuche bei Verwendung des Rhinopneumonitisvirusstammes RAC-H in niederer und hoher Passagenzahl. Völlige Inaktivierung mit einer BPL-Endkonzentration von 0,0003 % nach 120-stündiger Inkubationszeit bei + 37°C gelang nur bei Versuchen mit dem Rhinopneumonitisvirusstamm C 6505. Ob dieser Erfolg seine Ursache in dem geringen Infektiositätstiter des Ausgangsvirus (Titer: $10^{4,75} \text{KID}_{50}/\text{ml}$) hatte, oder Ausdruck einer Stammeigenschaft ist, bleibt zu klären. Das Ergebnis wird dadurch eingeschränkt, daß der Infektiositätsverlust der parallel angesetzten Temperaturkontrolle $3,25 \log \text{KID}_{50}/\text{ml}$ betrug. Im weiteren hatten wir unter Verwendung sogenannten proteinarmen und proteinfreien Erhaltungsmediums die BPL-Konzentration schrittweise erhöht und die Inkubationszeiten bei + 37°C verkürzt. Als optimale Inaktivierungsdaten erhielten wir so eine BPL-Endkonzentration von 0,15 % bei einer Einwirkungsdauer von 5 Minuten. Damit gelang es, Rhinopneumonitisvirus mit einem Infektiositätstiter von $7,5 \log \text{KID}_{50}/\text{ml}$ völlig zu inaktivieren, der Infektiositätstiter der Temperaturkontrollen blieb unverändert. Die in der Literatur vertretene Auffassung (204), daß überschüssiges BPL oder dessen Zerfallsprodukte (Betahydroxypropionsäure und/oder Betachlorpropionsäure) keiner Neutralisierung bedür-

fen, können wir nicht bestätigen. Unsere Versuche haben ergeben, daß bei Verwendung von 0,15 % BPL-Endkonzentration und einer Inkubationszeit von 5 bis 90 Minuten bei + 37°C mit anschließender Lagerung über 25 Stunden bei + 4°C starke zelltoxische Wirkungen zu beobachten waren, die nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden dagegen nicht mehr auftraten. Daraus müssen wir schließen, daß während der Inkubation bis zu 90 Minuten noch nicht die gesamte BPL-Menge für die Reaktion verbraucht war und auch die anschließende Lagerung bei + 4°C keinen vollständigen Zerfall des überschüssigen BPL bewirkte. Statt Lagerung bei + 4°C nach abgeschlossenem Inaktivierungsvorgang hatten wir daher in weiteren Versuchen das Virus-BPL-Gemisch bei + 4°C gegen phosphatgepufferte Kochsalzlösung dialysiert, eine zelltoxische Wirkung des Versuchsgemisches war danach nicht mehr zu beobachten.

Das Rhinopneumonitisvirus ist ein extrem thermolabiler Vertreter der Herpesvirusgruppe. Über die Thermoresistenz des Rhinopneumonitisvirus bei + 4°C liegen in der Literatur widersprüchliche Angaben vor (148); bereits nach 8-tägiger Lagerung bei + 4°C wurde ein völliger Verlust der Infektiosität beobachtet (60). Wir konnten - in Übereinstimmung mit MAYR u.M. (129) - bei Lagerungszeiten bis 144 Stunden keinen Titerverlust des Rhinopneumonitisvirus feststellen. PETZOLDT (148) gibt für die Inkubationstemperatur von + 37°C eine Inaktivierungszeit von 1 1/2 - 5, maximal 7 Tagen an; in unseren Versuchen betrug der Titerverlust nach 5-tägiger Lagerung

bei + 37°C in Abhängigkeit von dem verwendeten Virusstamm 2,25 bzw. 3,25 log KID₅₀/ml. Von Stammdifferenzen hinsichtlich der Thermolabilität des Rhinopneumonitisvirus berichtet auch von STRENGE (193), allerdings wurden hier nur Inkubationszeiten bis zu 3 Stunden in die Versuche einbezogen.

Bei Temperaturen von + 50°C verliert das Rhinopneumonitisvirus nach 5 - 10, maximal 15 Minuten seine Infektiosität (148). Über das Verhalten des Rhinopneumonitisvirus gegenüber Temperaturen über + 56°C werden in der Literatur keine Angaben gemacht.

Die Thermoinaktivierung von Viren verläuft nach WOESE (210) biphasisch mit einer schnell einsetzenden Wirkung auf die Virusnukleinsäure, gefolgt von einer verzögert auftretenden Wirkung für das Virusprotein.

Erwartungsgemäß gelang es uns mit Temperaturen von + 95°C und + 99°C Rhinopneumonitisvirus zu inaktivieren, die notwendigen Minimalzeiten betrugen hierbei 13 Sekunden bei Verwendung von proteinfreiem TC 199 und Silikonschläuchen im Durchflußverfahren bzw. 30 Sekunden bei Verwendung von proteinhaltigem Earle und Glasröhrchen. Aus unseren Versuchsergebnissen geht hervor, daß bei der Thermoinaktivierung von Rhinopneumonitisvirus das verwendete Gefäßsystem von entscheidender Bedeutung für den Inaktivierungserfolg ist. In Glasröhrchen abgefülltes Virus im erhitzten Wasserbad zu inaktivieren war zwar möglich, die Ergebnisse waren jedoch uneinheitlich. Ob bei unseren Versuchen zur Thermoinaktivierung von Virus im Silikonschlauch-Durchflußverfahren

der Proteinanteil des Mediums eine Schutzkolloidwirkung ausübte, oder ob wir bei 13 Sekunden Inaktivierungszeit die minimal notwendige Einwirkungsdauer erreicht hatten, konnten wir nicht klären, da aus technischen Gründen eine weitere Unterteilung der Zeitspanne zwischen 10 und 13 Sekunden nicht mehr möglich war.

Die Hamster und Meerschweinchen bildeten nach Immunisierung mit AEI-, BPL- und thermoinaktiviertem Rhinopneumonitisvirus humorale Antikörper.

Die Antikörpertiter nach Immunisierung von Hamstern mit vermehrungsfähigem Rhinopneumonitisvirus lagen nur dann über denen der Goldhamster, die mit inaktiviertem Virus immunisiert worden waren, wenn sich die Infektiositätstiter des Ausgangsmaterials entsprachen.

Die Meerschweinchen, die mit AEI-inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus (0,03 %; 16 Stunden; + 37°C) immunisiert worden waren, bildeten neutralisierende (Titer: 1 : 6) und komplementbindende (Titer: 1 : 64) Antikörper, deren Titer den nach Immunisierung mit vermehrungsfähigem Virus nachgewiesenen etwa entsprachen.

Um den Einfluß des gewählten Inaktivierungsverfahrens auf die Antigenität des inaktivierten Virus feststellen zu können, müssen wir die Immunisierungsergebnisse der Hamstergruppen, die AEI-, BPL- und thermoinaktiviertes Virus ohne Adjuvanzzusatz erhielten, mit den serologischen Untersuchungsergebnissen der Hamstergruppen vergleichen, die mit vermehrungsfähigem Rhinopneu-

monitisvirus immunisiert worden waren.

Wenn wir die nach Immunisierung gebildeten humoralen Antikörper hierbei als Ausdruck der erhaltenen Immunogenität des Virus werten, so hatten AEI-Inaktivierung mit 0,03%igem AEI und 16-stündiger Inkubation bei + 37°C und BPL-Inaktivierung mit 0,15 % BPL nach 2-stündiger Inkubation bei + 37°C den geringsten schädigenden Einfluß. Das AEI-inaktivierte Virus rief in den immunisierten Tieren die Bildung von Antikörpern hervor, deren durchschnittliche Titer geringgradig über denen der nach Immunisierung mit BPL-inaktiviertem Virus gebildeten lagen, nach Verabfolgung von thermoinaktiviertem Virus dagegen konnten wir in den immunisierten Hamstern lediglich komplementbindende Antikörper mit geringen Titern nachweisen.

Zwischen der Höhe der Infektiositätstiter des Ausgangsvirus und Immunisierungserfolg bestand eine enge Beziehung. AEI-inaktiviertes Virus, dessen ursprünglicher Infektiositätstiter $10^7 \text{KID}_{50}/\text{ml}$ oder $10^{7,25} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ betragen hatte, induzierte in den immunisierten Hamstern die Bildung von neutralisierenden Antikörpern mit durchschnittlichen Titern von 1 : 5 und von komplementbindenden Antikörpern mit durchschnittlichen Titern von 1 : 20 am 11. Tag nach der Reimmunisierung. Diese Antikörper waren am 20. Tage nach der Reimmunisierung im Durchschnitt wieder auf Werte $< 1 : 4$ abgesunken, die Durchschnittstiter der komplementbindenden Antikörper betrugen zum gleichen Zeitpunkt 1 : 16. Hatten wir für die Inaktivierung mit AEI Ausgangsvirus

mit einem Infektiositätstiter von $10^{7,75}$ KID₅₀ ml verwendet, so konnten wir in den damit immunisierten Hamstern neutralisierende Antikörper mit durchschnittlichen Titern von 1 : 16 am Tag 8 nach der Reimmunisierung nachweisen, die zum Tag 19 nach der Reimmunisierung auf 1 : 18 gestiegen waren und 9 Tage später noch immer mit Durchschnittstitern von 1 : 11 nachweisbar blieben. Komplementbindende Antikörper waren in dieser Tiergruppe am 15. Tag nach abgeschlossener Grundimmunisierung mit Durchschnittstitern von 1 : 50 gebildet worden, die zum 19. Tag nach Reimmunisierung auf durchschnittliche Werte von 1 : 36 abgesunken waren. Die Notwendigkeit, mit möglichst hohen Virusquantitäten zu arbeiten, um mit inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus Immunisierungserfolge zu erzielen, wird daraus ersichtlich.

Wie schon angeführt, konnten wir eine lineare Beziehung zwischen Dauer der Einwirkungszeit bei BPL-Inaktivierung und Immunogenität des inaktivierten Virus feststellen. Eine definitive Klärung dieser Beziehung läßt unsere Versuchsanordnung allerdings nicht zu, da das aber zwei Stunden inaktivierte Rhinopneumonitisvirus gleichzeitig gegenüber dem nach 10 Stunden inaktivierten Virus einen höheren Ausgangstiter besaß und wir aus den Versuchen mit 151-inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus wissen, daß der Ausgangstiter des Virus sich entscheidend auf die Bildung postvokzinaler Antikörper auswirkt.

Bezüglich der Antikörperbildung wurde in allen

Immunisierungsversuchen folgende Gesetzmäßigkeit beobachtet: die komplementbindenden Antikörper wurden schneller gebildet als die neutralisierenden Antikörper und erreichten bereits nach der Grundimmunisierung Titer, die durch die Reimmunisierung nicht mehr gesteigert werden konnten. Auf die Bildung neutralisierender Antikörper dagegen wirkte die Reimmunisierung als Booster.

Von UHR und FINKELSTEIN (202) ist beschrieben, daß das immunologische Gedächtnis mit der Bildung von 7S-Antikörpern (IgG) korreliert, nicht dagegen mit der von 19S-Antikörpern (JgM). Die Bildung der neutralisierenden und komplementbindenden Antikörper bei den immunisierten Hamstern und ihre immunologische Reaktion auf die Reimmunisierung bzw. die Belastungsinfektion entsprechen dieser Beobachtung. Die von uns gewählten Blutentnahmeintervalle stellen keine kontinuierliche Prüfung der Antikörperbildung, sondern lediglich eine stichprobenweise Kontrolle dar, aus der sich die beschriebene Gesetzmäßigkeit jedoch erkennen läßt.

Die bisher besprochenen Immunisierungsergebnisse hatten wir nach Immunisierung der Versuchstiere mit inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus ohne jeden Zusatz oder aber - bei den Tieren, die AEI- oder BPL-inaktiviertes Virus appliziert bekamen, dessen Ausgangstiter $10^{7,75} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ betragen hatte -, nach Zusatz gleicher Mengen Viruserhaltungsmedium zum Immunisierungsantigen erzielt.

Verwendeten wir nun bei der Immunisierung Aluminiumhydroxid oder Mineralöl als Adjuvans, so konnte dadurch lediglich die Bildung komplexbindender Antikörper zu höheren Quantitäten stimuliert werden, unabhängig davon, in welcher Kombination wir inaktiviertes Virus und jeweiliges Adjuvans einsetzten. Den besten Effekt hinsichtlich der Bildung von komplexbindenden Antikörpern erzielten wir hierbei mit der Kombination: AEI-inaktiviertes Virus + $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Hinsichtlich der Stimulation von neutralisierenden Antikörpern erwies sich das BPL-inaktivierte Virus mit Adjuvanzzusatz - gleich ob $\text{Al}(\text{OH})_3$ oder Mineralöl - dem AEI-inaktivierten in Kombination mit diesen Adjuvantien überlegen. Der Verlauf der Bildung neutralisierender Antikörper hinsichtlich Titer und Persistenz war vergleichbar dem der Goldhamster, die mit hochtitrigem inaktiviertem Virus ohne Adjuvanzzusatz immunisiert worden waren. Der einzige Unterschied hierbei bestand darin, daß bei den Hamstern, die AEI- oder BPL-inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ oder Mineralöl als Adjuvans erhalten hatten, ein weniger rasches Absinken der gebildeten neutralisierenden Antikörper nach Reimmunisierung mit ebenfalls adjuvanshaltiger Vakzine beobachtet werden konnte als bei den Tieren, die lediglich inaktiviertes Virus mit Mediumzusatz erhalten hatten. Bei Verwendung von Saccharomyces als Adjuvans wurde im Vergleich zu den Tieren, die AEI- oder BPL-inaktiviertes Virus ohne Adjuvans mit gleichem Ausgangstiter erhalten hatten, kein Einfluß auf die

Bildung von Antikörpern festgestellt.

Die von ŠKODA und WITTMANN (184) nach Immunisierung von Schweinen mit EEJ-inaktiviertem Aujeszkyvirus erhaltenen Ergebnisse sind natürlich nicht direkt mit unseren Immunisierungsergebnissen vergleichbar; jedoch beobachteten auch diese Autoren, daß ihre Versuchstiere nach der Grundimmunisierung neutralisierende Antikörper lediglich mit Titern von 1:1 bis 1:4 bildeten, die erst nach Revakzination auf Werte von maximal 1:32 anstiegen.

Auch in den von SHIMIZU u.M. (177, 178) und KAWAKAMI u.M. (89) beschriebenen Vakzinationsversuchen mit BPL-inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus an Fohlen und tragenden Stuten hatte das BPL-inaktivierte Rhinopneumonitisvirus erst über einen Boostereffekt - entweder nach vorausgegangener natürlicher Rhinopneumonitisinfektion bei Fohlen oder Präimmunisierung mit Lebendvakzine bei Stuten - zur Bildung humoraler Antikörper geführt.

Die Eignung der von uns verwendeten Art der Belastungsprüfung hängt von der Hamstervirulenz des zur Challenge-Infektion verwendeten Rhinopneumonitisvirus ab. Wie unsere Titrationsversuche in erwachsenen, ca. 125 g schweren Goldhamstern ergaben, besaß der Stamm Army 183 nach fünf Hamsterpassagen bei intraperitonealer Applikation eine Hamster LD₅₀ von nur 10^{3,75}. Erwachsene Goldhamster sind schwieriger virusspezifisch zu schädigen als die

häufig verwendeten Baby- oder Junghamster. Für Immunisierungsversuche sind jedoch erwachsene, möglichst schwere Hamster nötig, da sie erfahrungsgemäß die besseren Antikörperbildner sind.

Bei Applikation einer Virusverdünnung von 1:100 starben 6 von 10 infizierten Hamstern, bei Verdünnung von 1:1000 starben 7 Tiere. Unsere daraus errechnete Challengevirusdosis war in der Lage, 50 % der nicht immunisierten Kontrollhamster virusspezifisch zu töten. Insofern ist das eingesetzte Testverfahren zur Prüfung des Impfschutzes gegenüber einer Infektion als sensibel anzusehen.

Entsprechend den Erfahrungen anderer Autoren (1, 2, 72, 78, 184, 221) konnten auch wir keine direkte Korrelation zwischen humoral nachweisbaren postvakzinalen Antikörpern und Schutzwirkung gegenüber Belastungsinfektion feststellen. Stellt man eine Verbindung her zwischen dem Schweregrad der virusbedingten Erkrankung nach der Challenge-Infektion und den humoralen Antikörpern, die die erkrankten Tiere bis zum Zeitpunkt der Infektion gebildet hatten, so fällt auf, daß die Hamster, die keine neutralisierenden Antikörper entwickelt hatten und auf die Infektion klinisch ansprachen, schwerer erkrankten als die Tiere, die neutralisierende Antikörper entwickelt hatten und ebenfalls postinfektionell erkrankten. Die geringe Tierzahl läßt keine gesicherte Aussage zu, zumal auch Hamster, die während der Gesamtimmunisierungszeit keine neutralisierenden Antikörper entwickelt hatten die Infektion reaktions-

los überstanden.

Die serologische Kontrolle der Reaktion der Hamster auf die Challenge-Infektion hatte ergeben, daß alle untersuchten Tiere, die inaktiviertes Rhinopneumonitisvirus mit Adjuvanzzusatz erhalten hatten, auf die Belastungsinfektion mit einem stärkeren Anstieg der neutralisierenden Antikörper reagierten als die Tiere, die ohne Verwendung von Adjuvans immunisiert worden waren. Ganz offensichtlich führt die Immunsierung unter Verwendung von Adjuvantien zur vermehrten Bildung von γ S- γ - Globulinen, die Challenge-Infektion mit dem homologen, vermehrungsfähigen Virus bedingt über einen erneuten Antigenkontakt auf Grund einer anamnestischen Reaktion der immunisierten Hamster dann das Ansteigen der neutralisierenden Antikörper. Ob die Immunsierung mit inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus auch die Bildung sekretorischer Antikörper vom Immunglobulintyp IgA, wie sie nach Infektion mit vermehrungsfähigen Herpesviren gebildet werden, stimulierte, können wir auf Grund des positiven Ausgangs des Belastungsversuches zumindest bei den Hamstern, die nach der Immunsierung keine neutralisierenden humoralen Antikörper gebildet hatten, lediglich vermuten. Aus der Literatur ist bekannt, daß auch nach Impfung mit inaktiviertem Influenzavirus (66, 88, 113, 138, 205) und Parainfluenzavirus (185) beim Menschen sekretorische IgA-Antikörper lokal nachgewiesen werden konnten.

Unsere Immunsierungsversuche mit inaktivier-

tem Rhinopneumontisvirus haben ergeben, daß es möglich ist, Rhinopneumontisvirus unter Erhalt seiner immunisierenden Eigenschaften zu inaktivieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Möglichkeit geprüft, Rhinopneumonitisvirus unter Erhalt seiner immunisierenden Eigenschaften chemisch und physikalisch zu inaktivieren. Unter Verwendung von Acetyläthylenimin (AEI), Betapropiolakton (BPL) und Hitze gelang es, die Infektiosität von Rhinopneumonitisvirus aufzuheben. Als optimale Bedingungen bei chemischer Inaktivierung erwiesen sich AEI in 0,03 %iger Endkonzentration (Inkubationstemperatur +37°C, Inkubationsdauer 16 Stunden) und BPL in 0,15 %iger Endkonzentration (Inkubationstemperatur +37°C, Inkubationsdauer 5 Minuten). Eine Thermoinaktivierung gelang in 13 Sekunden bei +95°C unter Verwendung eines Silikonschlauch-Durchflußverfahrens. Erwachsene syrische Goldhamster bildeten nach Immunisierung mit AEI- und BPL-inaktiviertem Rhinopneumonitisvirus neutralisierende und komplementbindende Antikörper. Zugabe von $\text{Al}(\text{OH})_3$ oder Mineralöl zum Antigen verstärkte die Bildung von Antikörpern und verlängerte deren Persistenz. Nach Immunisierung mit thermoinaktiviertem Virus kam es lediglich zur Bildung von komplementbindenden Antikörpern mit geringeren Titern. Zwischen Virusgebrauchsdosis und Antikörperbildung bestand eine direkte Korrelation. Im Infektionsbelastungsversuch erwies sich die Immunisierung mit BPL-inaktiviertem Virus der mit AEI-inaktiviertem als geringgradig überlegen. Eine Korrelation zwischen Antikörpergehalt der Seren der immunisierten Hamster und Schutzwirkung bestand nicht. Über die Schutzwirkung von thermoinaktiviertem Virus ist keine Aussage möglich, da aus dieser Immunisierungsgruppe zu wenig Tiere den Belastungsversuch erreichten.

SUMMARY

Inactivation of rhinopneumonitis virus with relation to its immunogenic potency

The tool of this dissertation was to examine the immunogenic potency of rhinopneumonitis virus after its chemical and physical inactivation. The infectivity of the virus was destroyed using acetylene-ethylene-imine (AEI), beta-propiolactone (BPL), and heat. The following optimal conditions for chemical inactivation could be established: use of 0,03 % AEI for 16 hours at +37°C; 0,15 % BPL for 5 minutes at +37°C. Thermic inactivation in a continuous flow system using silicone rubber tubes was complete after 13 seconds at +95°C. Adult Syrian hamsters developed neutralizing and complement fixing antibodies after immunization with AEI- and BPL-inactivated rhinopneumonitis virus. Al(OH)₃ or mineral oil given as an adjuvant enhanced the titers of the antibodies and prolonged their persistence. Immunization with virus inactivated by heat resulted only in the formation of complement fixing antibodies in a small amount. A direct correlation existed between the dose of antigen used for the immunization and the resulting antibody titers. Taking the challenge infection as a criterion of protection, BPL-inactivated antigen showed a slight superiority in comparison to virus inactivated by AEI. No correlation could be detected between the antibody titers of immunized hamsters and their resistance to the challenge infection. Only few animals reached the challenge test after immunization with rhinopneumonitis virus inactivated thermically; thus a clear statement on its protective potency is not possible.

6. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) Babkin, V.F., M.T. Pkof'eva
and Z.P. Naumets (1973) Results of aerosol im-
munization against avian
infectious laryngotra-
cheitis
Veterin. 51, 38-40
- 2) Bartha, A. (1962) Immunisierungsversuche
mit dem attenuierten
Stamm "K" des Aujeszky-
Virus
Magy Állatorv. Lap. 17,
321
- 3) Bartha, A., D. Feher und
M. Palyusik (1959) An attempt to impart im-
munity against cattarhal
equine influenza by means
of the live virus
Acta vet. hung. 2, 355-
359
- 4) Bartha, A. und J. Kojnok
(1963) Active immunization against
Aujeszky's disease
Kongreßberichte des XVII.
Welttierärztekongresses
1, 531
- 5) Bauer, K. (1970) Die Inaktivierung und die
Antigenität des MKS-Virus
durch Äthyläthylenimin und
die Eignung des inakti-
vierten Virus zur Impf-
stoffherstellung
Zbl. Bakt. I. Orig. 213,
285

- 6) Bass, E.P., R.L. Sharpee
und W.H. Beckenhauer (1973) Equine viral rhinopneumo-
nitis: pathography and
prophylaxis
Norden News, Spring 1973
Norden Laboratories, USA
- 7) Bazylev, P.M. (1959) Hidrookis-alljuminivaja
formolembryonvakcina pro-
tiv bolezni Aueski
Biopreparaty, Virusy, Mi-
kroby 8, 71 - 79
- 8) Beach, J.R. (1930) The virus of laryngotra-
cheitis of fowls
Sci. 72, 633 - 634
- 9) Beach, J.R. (1931) Zit. nach Beaudette, 1949
- 10) Beach, J.R. (1931) A filtrable virus the
cause of infectious laryn-
gotracheitis of chickens
J. Exp. Med. 54, 809
- 11) Beach, J.R., O.W. Schalm
and R.E. Lubbehusen (1934) Immunization against in-
fectious laryngotrachei-
tis by "intrabursal" in-
jections of virus
Poult. Sci. 13, 218 - 226
- 12) Beaudette, F.R. (1949) Twenty years of progress
in immunization against
virus diseases of birds
J.A.V.M.A. 115, 232 - 243

- 13) Beaudette, F.R. and
C.B. Hudson (1933)
Experiments on immuniza-
tion against laryngotra-
cheitis in fowls
J.A.V.M.A. 82, 460 - 476
- 14) Beaudette, F.R. and
C.B. Hudson (1939)
The viability and immuni-
zing value of egg-propa-
gated laryngotracheitis
virus
J.A.V.M.A. 95, 333 - 339
- 15) B  l  dy, J. und
G. Iv  novics (1954)
Immunisierung von Labora-
toriumstieren mit dem Vi-
ris der Aujeszky'schen
Krankheit nach dessen In-
aktivierung mit UV-Strah-
len
Acta Microbiol. Hung. 2,
151 - 160
- 16) Bengelsdorff, H.J. und
D. Bernhardt (1973)
Experimentelle und prakti-
sche Erfahrungen bei der
Vakzination von Küken mit
Putenherpesvirus zum
Schutz gegen die Marek-
sche Krankheit
Wien. tierärztl. Mschr.
60, 254 - 258
- 17) Benton, W. J., M.S. Cover
and L.M. Greene (1958)
The clinical and serologi-
cal response of chickens
to certain laryngotrachei-
tis viruses
Av. Dis. 2, 383 - 396

- 18) Berbinschi, C. (1963)
Cercetari cu privire la
Modificarea Patogenita-
tii virusului bolii lui
Aujeszky, din suspensii-
le de creier virulent sa-
poninat
Lucrările stiintifice,
IPIA 12, 345
- 19) Berbinschi, C. und
M. Papadopol (1966)
Cercetari privindumuniza-
rea in boala lui Aujeszky
cu vaccin preparat din
virus de cultura absorbit
si saponinat
Lucrările Inst. Pasteur 3,
71
- 20) Berbinschi, C.,
M. Papadopol und
M. Marta (1968)
Untersuchungen über den
prophylaktischen Wert der
inaktivierten Aujeszkyvak-
zine in Schweinezuchtbe-
trieben
Arch. Vet. 5, 107 - 114
- 21) Bibrack, B. und
G. Härtl (1971)
Mikrotest zum Nachweis neu-
tralisierender Antikörper
gegen das Rhinopneumonitis-
virus der Pferde
Zbl. Vet. Med. B 18, 517 -
526
- 22) Biggs, P.M., L.N. Payne,
B.S. Milne, A.E. Churchill,
R.C. Chubb, D.G. Powell
and A.H. Harris (1970)
Field trials with an atte-
nuated cell-associated
vaccin for Marek's disease
Vet. Rec. 87, 704 - 709

- 29) Brown, F., T.E. Cartwright
and D.L. Stewart (1963)
The effect of various in-
activating agents on the
viral and ribonucleic acid
infectivities of foot-and-
mouth disease virus and
its attachment to suscep-
tible cells
J. Gen. Microbiol. 31, 179
- 30) Bruner, D.W., P.R. Edwards
and F.E. Hull (1948)
Equine virus abortion vac-
cine
The Blood Horse 53, 666
- 31) Bruner, D.W., E.R. Doll
and F.E. Hull (1949)
Studies on virus abortion
The Blood Horse 58, 31
- 32) Bryans, J.T. (1966)
Control of equine infec-
tious disease by immuni-
zation
Corn. Vet. 56, 278 - 287
- 33) Bryans, J.T. and E.R. Doll
(1959)
Multiplication of equine
rhinopneumonitis virus in
syrian hamsters
Corn. Vet. 49, 525 - 529
- 34) Burnet, F.M. (1934)
The propagation of the vi-
rus of infectious laryngo-
tracheitis on the chorioal-
lantoic membrane of the de-
veloping egg
Brit. J. Exp. Path. 15,
52 - 55

- 35) Burnet, F.M. (1936) Immunological studies with the virus of infectious laryngotracheitis of fowls using the developing egg technique
J. Exp. Med. 63, 685 - 701
- 36) Carmichael, L.E. (1970) Herpesvirus canis: Aspects of pathogenesis and immune response
J.A.V.M.A. 156, 1714 - 1721
- 37) Chang, B.W., V.J. Yates, A.H. Dardiri and D.E. Fry (1960) Some observations of the propagation of infectious laryngotracheitis virus in tissue culture
Av. Dis. 4, 384 - 390
- 38) Chow, T.L. (1968) Comments on infectious bovine rhinotracheitis immunization
J.A.V.M.A. 152, 857
- 39) Churchill, A.E. (1965) The development of a live attenuated infectious laryngotracheitis vaccine
Vet. Rec. 77, 1227 - 1234
- 40) Churchill, A.E. and P.M. Biggs (1967) Agent of Marek's disease in tissue culture
Nature 215, 528 - 530

- 41) Churchill, A.E., R.C. Chubb
and W.Baxendale (1969) The attenuation, with loss
of oncogenicity, of the
herpes-type virus of Ma-
rek's disease (strain
HPRS-16) on passage in
cell culture
J. Gen. Virol. 4, 557 - 564
- 42) Churchill, A.E., L.N. Payne
and R.C. Chubb (1969) Immunization against Ma-
rek's disease using a live
attenuated virus
Nature 221, 744 - 747
- 43) Churchill, A.E.,
W. Baxendale and
G. Carrington (1973) Virasemia and antibody de-
velopment in chicks follo-
wing the administration of
turkey herpes virus
Vet. Rec. 92, 327 - 333
- 44) Cover, M.S. and
W.J. Benton (1957) The isolation of a viral
agent from chickens show-
ing respiratory distress
Av. Dis. 1, 54 - 61
- 45) Crandell, R.A. (1971) Virologic and immunologic
aspects of feline viral
rhinotracheitis virus
J.A.V.M.A. 158, 922 - 931
- 46) Dardiri, A.H., V.J. Yates,
P.W. Chang and D.E. Fry
(1958) Infectious laryngotrachei-
tis studies
Abstr. Av. Dis. 2, 538

- 47) Davidson, A.P. and D. Stone
(1972) A multivalent calf virus pneumonia vaccine
VII. Internat. Tagung, Rinderkrankheiten, London, 1972
- 48) Dilovski, M. (1969) Über die UV-Inaktivierung des Aujeszky-Virus
Zbl. Vet. Med. B 16, 346
- 49) Dilovski, M. (1972) Der Einfluß der ionisierenden Bestrahlung auf Tierviren
I. Gamma-Inaktivierung des Aujeszkyvirus
Zbl. Vet. Med. B 19, 128 - 135
- 50) Dimock, W.W.,
P.R. Edwards and
D.W. Bruner (1943) Equine virus abortion
ref.: Vet. J. 99, 27 - 30
- 51) Doll, E.R. (1961) Immunization against viral rhinopneumonitis of horses with live virus propagated in hamsters
J.A.V.M.A. 139, 1324 - 1330
- 52) Doll, E.R. and
F.E. Hull (1951) Observation on hemolytic icterus of newborn foals
Corn. Vet. 41, 14 - 35

- 53) Doll, E.R., M.G. Richards,
M.E. Wallace and J.T. Bryans
(1952) The influence of an equine
fetal tissue vaccine upon
hemagglutination activity
of mare serums: Its rela-
tion to hemolytic icterus
of newborn foals
Corn. Vet. 42, 495 - 505
- 54) Doll, E.R., M.E. Wallace,
J.T. Bryans and
M.G. Richards (1953) Complement-fixation anti-
body response following
administration of equine
virus abortion vaccine
Am. J. Vet. Res. 14, 46 -
48
- 55) Doll, E.R., M.E.W. Crowe,
J.T. Bryans and
W.H. McCollum (1955) Infection immunity in
equine virus abortion
Corn. Vet. 45, 387 - 410
- 56) Doll, E.R., J.T. Bryans
and W.H. McCollum (1959) A procedure for evalua-
ting the antigenicity of
killed virus vaccines for
equine rhinopneumonitis
Corn. Vet. 49, 212 - 220
- 57) Doll, E.R. and
J.T. Bryans (1962) Incubation periods for
abortion in equine viral
rhinopneumonitis
J.A.V.M.A. 141, 351 - 354
- 58) Doll, E.R. and
J.T. Bryans (1963) Immunization of young hor-
ses against viral rhino-
pneumonitis
Corn. Vet. 53, 24 - 41

- 59) Doll, E.R. and J.T. Bryans
(1963) A planned infection program
for immunizing mares against
viral rhinopneumonitis
Corn. Vet. 53, 249 - 262
- 60) Doll, E.R. and J.T. Bryans
(1963) Epizootology of equine viral
rhinopneumonitis
J.A.V.M.A. 142, 31
- 61) Epstein, M.A., B.G. Achong,
A.E. Chruchill and
P.M. Biggs (1968) Structure and development
of the herpes-type virus
of Marek's disease
J. Nat. Canc. Inst. 41,
805 - 820
- 62) Fellowes, O.N. (1965) Comparison of the inacti-
vation and antigenicity of
foot-and-mouth disease vi-
rus by acetyl-ethylene-
imine and by combined ef-
fect of UV-light and BPL
J. Immunol. 95, 1110
- 63) Fisher, W. and
G.L. Ott (1966) Experimental immunization
of cats against a chronic
respiratory virus
Vet. Med. 61, 1182 - 1189
- 64) Fritzsche, K. (1937) Versuche zur Erforschung
und Bekämpfung der Marek-
schen Geflügellähme
a) Versuche über die Aus-
scheidung des Hühnerlähme-
virus mit dem Kot und
über die natürliche In-
fektionsweise
Zschr. Inf. Krh. 52,
51 - 69

- 65) Fritzsche, K. (1937)
Versuche zur Erforschung
und Bekämpfung der Marek-
schen Geflügellähme
c) Schutzimpfungsversuche
mit einer Formalvakzi-
ne
Zschr. Inf. Krh. 52, 126 -
127
- 66) Fulk, R.V., D.S. Fedson,
M.A. Huber, J.R. Fitz-
patrick, B.F. Howar and
J.A. Kasel (1969)
Antibody responses in child-
ren and elderly persons fol-
lowing local or parenteral
administration of inactiva-
ted influenza virus vaccine,
A₂/Hong Kong/68 variant
J. Immunol. 102, 1102
- 67) Furness, T.L. (1945)
Prophylactic vaccination
against infectious laryn-
gotracheitis
Aust. Vet. J. 21, 142
- 68) Gelenczi, E.F. and
E.W. Marty (1964)
Studies on a tissue-culture
modified infectious laryn-
gotracheitis virus
Av. Dis. 8, 105 - 122
- 69) Gelenczi, E.F. and
E.W. Marty (1965)
Strain stability and immu-
nologic characteristics of
a tissue-culture-modified
infectious laryngotrachei-
tis virus
Av. Dis. 2, 44 - 56

- 70) Gibbs, C.S. (1934) Infectious laryngotracheitis vaccination
Mass. Agr. Exp. Sta. Bull. 311
- 71) Gratzl, E. und K. Köhler (1968) Spezielle Pathologie und Therapie der Geflügelkrankheiten
Verlag Ferdinand Enke: Stuttgart
- 72) Haralambiev, H., K. Mermerski, S. Simeonov, M. Jotov, I. Stoev, K. Dimitrov und I. Nikolov (1967) Untersuchungen über die Immunogenität der mit Äthanol inaktivierten Vakzine gegen die Aujeszky'sche Krankheit
Arch. Exp. Vet. Med. 21, 501 - 507
- 73) Hartwigk, H. (1933) Versuche zur aktiven Immunisierung von Hühnern gegen die Marek'sche Geflügel lähme (Neurolymphomatose)
Zschr. Inf. Krh. 50, 34 - 40
- 74) Hitchner, S.B. and P.G. White (1958) A comparison of embryo and bird infectivity using five strains of laryngotracheitis virus
Poult. Sci. 37, 684 - 690
- 75) Hitchner, S.B. and R.W. Winterfield (1960) Revaccination procedures for infectious laryngotracheitis
Av. Dis. 4, 291 - 303

- 76) Honegger, K.E., B.L.McMurray, R.H. Gledhill and H.G. Purchase (1972) Performance response of a Leghorn type layer flock to turkey herpesvirus vaccine Av. Dis. 16, 78-85
- 77) Horvath, Z., A. Bartha, L. Papp and M. Juhasz (1965) On feline rhinotracheitis Acta vet. Ac. Sci. hung. 15, 415 - 420
- 78) Howes, D.W., G.A. Tannock and B. Sinkowic (1962) The assessment of a potency standard for ILT-vaccine in dose response experiments Proc. XIIth World's Poultry Congress, Sidney, Australia, 1962, 344 - 348
- 79) Hudson, C.B. and F.R. Beaudette (1932) Infection of the cloaca with the virus of infectious bronchitis Sci. 76, 34
- 80) Hungerford, T.G. (1962) Diseases of poultry Verlag Angus and Robertson: Sydney and London, 3rd edition, 93 - 107
- 81) Hunt, S. (1959) The feather follicle method of vaccinating baby chicks with laryngotracheitis Proc. Poult. Sci. Conv., 1959, Univ. of Sidney, 29

- 82) Hunt, S. (1966) New instruments for infectious laryngotracheitis vaccination
Aust. Vet. J. 42, 30 - 31
- 83) Ivanovičová, S., R. Škoda, V. Mayer and F. Sokol (1963) Inactivation of Aujeszky disease (Pseudorabies) virus by nitrous acid
Acta vir. 7, 7 - 15
- 84) Jones, T.C., C.A. Gleisler, F.D. Maurer, M.W. Hale and T.O. Roby (1958) Transmission and immunization studies on equine influenza
Am. J. Vet. Res. 2, 243 - 253
- 85) Jordan, F.T.W. (1964) The control of infectious laryngotracheitis
Zbl. Vet. Med. B 11, 15
- 86) Kaaden, O.R., B. Dietzschold and S. Ueberschär (1974) Vaccination against Marek's disease: Immunizing effect of purified turkey herpes virus and cellular membranes from infected cells
Med. Microbiol. Immunol. 159, 261 - 269
- 87) Kahrs, R.F., R.B. Hillman and J.D. Todd (1973) Observations on the intranasal vaccination of pregnant cattle against infectious bovine rhinotracheitis and parainfluenza-3 virus infection
J.A.V.M.A. 163, 437 - 441

- 88) Kasel, J.A., E.B. Horne,
R.V. Fulk, Y. Togo, M. Huber
and R.B. Hornick (1969)
Antibody responses in nasal secretions and serum of elderly persons following local or parenteral administration of inactivated influenza virus vaccine
J. Immunol. 102, 555
- 89) Kawakami, Y., Y. Shimizu
and N. Murase (1974)
Vaccination of mares against abortion due to equine rhinopneumonitis virus
Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth. 69, 13 - 17
- 90) Kelling, C.L., I.A. Schipper,
G.E. Strum, R.B. Carlson
and J. E. Tilton (1973)
Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) abortion observations on incidence in vaccinated and exposed cattle
Corn. Vet. 63, 383 - 389
- 91) Kelling, C.L.,
I.A. Schipper and
C.N. Haugse (1973)
Antibody response in calves following administration of attenuated infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 27, 309
- 92) Kelling, C.L., I.A. Shipper
und C.N. Haugse (1973)
Vaccination of calves with modified live infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus vaccines
North. Dak. Farm Res. 31,
17 - 19

- 93) Kendrick, J.W., C.J. York
and D.G. McKercher (1956) A controlled field trial
of a vaccine for infectious bovine rhinotracheitis
Proc. U.S. Livestock San.A.,
60th Ann. Meeting, 155 -
158
- 94) Kendrick, J.W. and
B.J. Osburn (1973) Immunologic response of
the bovine fetus to inactivated infectious bovine
rhinotracheitis-infectious
pustular vulvovaginitis
Am. J. Vet. Res. 34,
1567 - 1571
- 95) Kernohan Zit. nach Beaudette, 1949
- 96) Kilgore, R.L. (1972) Prophylactic efficacy of a
Marek's disease vaccine in
broiler and replacement
layer chickens
Av. Dis. 16, 72 - 77
- 97) Kilgore, R.L. (1974) A comparison of the prophylactic
efficacy of lyophilized and cell-associated
turkey herpesvirus against
Marek's disease
Av. Dis. 18, 45 - 49
- 98) Kilgore, R.L. and
E.S. Brokken (1973) Marek's disease vaccine:
prophylactic efficacy of a
lyophilized turkey herpesvirus of chick cellculture
origin
Av. Dis. 17, 137 - 141

- 99) Koch, A. und
E. Abraham (1952) Immunisationsversuche mit
dem Aujeszky'schen Virus
Acta vet. hung. 2, 270 -
279
- 100) Koda, Y., S. Yamada,
T. Ichihara and
T. Ichihara (1972) Experiments on infectious
laryngotracheitis (ILT)
virus in tissue culture
1. Modification and some
properties of ILT virus
J. Jap. Vet. Med. Ass. 25,
668 - 671
- 101) Kolar, J.R. jr.,
I.L. Shechmeister and
L.E. Strack (1973) Field experiments with for-
malinkilled virus vaccine
against infectious bovine
rhinotracheitis, bovine
viral diarrhoea and parain-
fluenza-3
Am. J. Vet. Res. 34, 1469 -
1471
- 102) Kolmer, J. A. and
F. Boerner (1941) Approved laboratory technic
Verlag D. Appleton-Century
Co. Inc., New York, 3rd ed.,
616
- 103) Kottaridis, S.D. and
R.E. Luginbuhl (1969) Control of Marek's disease
by the use of inoculated
chicken embryo fibroblasts
Nature 221, 1258 - 1259

- 104) Kress, F. (1946) Versuche zur Bekämpfung des virusbedingten Abortus beim Pferd mit Organvakzine M
Wien. tierärztl. Mschr. 33,
121 - 126
- 105) Kretzschmar, C. (1973) Zum Wert der aktiven Immunisierung mit Lebendimpfstoff bei der Sanierung der Bestände von Aujeszky'scher Krankheit
Mh. Vet. Med. 28, 927 - 931
- 106) Kubin, G. und O. Kölbl (1969) Immunisierung von Pferden gegen die Rhinopneumonitis (Stutenabort) mit einem an Ferkelhodenzellen adaptierten Lebendvirus
Wien. tierärztl. Mschr. 56,
275 - 280
- 107) Lancaster, J.E., W.K. Barr and B.R. Bartlett (1973) A marek's disease vaccination trial
Poult. Sci. 52, 2, 1450 - 1454
- 108) Lissenko, I.P., A.M. Zimbal und M.Z. Kulbatschnaja (1965) Prigotovlenie i laboratornoe ispitanie vakzini UNIEV protiv bolesni Aujeszky i assozirovannoj vakzini protiv tschumi swinej i bolesni Aujeszky
Veterin. 42, 38 - 43

- 109) Ljubašenko, S.A.,
A.F. Tjul'panova und
V.M. Grišin (1960)
Opyt spečificeskoj pro-
filaktiki lečenia i ne-
kotorie voprosy epizoo-
tologii boleszni Aueski
pušnej zverej
Veterin. 37, 46 - 51
- 110) LoGrippe, G.A. and
F.W. Hartmann (1955)
Antigenicity of β -Ropio-
lactoneinactivated virus
vaccines
J. Immun. 75, 123 - 128
- 111) Lutz, E.E., D.L. Hughes
and W.G. Schmutz (1968)
Calfhood viral diseases
and early vaccination stu-
dies
Vet. Med. 63, 1067 - 1068
- 112) Madin, S.M., C.J. York
and D.G. McKercher (1956)
Isolation of the infectious
bovine rhinotracheitis vi-
rus
Sci. 124, 721 - 722
- 113) Mann, J.J., R.H. Waldman,
Y. Togo, G.G. Heiner,
A.T. Dawkins and
J.A. Kasel (1968)
Antibody response in respi-
ratory secretions of volun-
teers given live and dead
influenza virus
J. Immunol. 100, 726
- 114) Manninger, R. (1944)
Ujabb adatok a kancák fer-
tőző elvetélésének ismere-
téhez
Közl Bánya és kohómérn oszt
32, 361 - 365

- 115) Manninger, R. (1949) Virus abortion in mares
XIV. Int. Vet. Congr.,
London 1949, 2, 479 - 482
- 116) Manninger, R. (1951) Ronienie u klaczy na tle
wirusowym
Med. weteryn. 2, 169-174
- 117) Manninger, R. (1958) Virusabortus der Stuten
und Influenza der Pferde
DTW 65, 369 - 373
- 118) Manninger, R. und
A. Marcis (1937) Versuche mit dem Erreger
der Aujeszky'schen Krank-
heit
Zschr. Inf. Krh. 51, 25 - 31
- 119) Manninger, R. und
J. Csontos (1941) Virusabortus der Stuten
DTW 49, 105 - 108
- 120) Marek, J. (1907) Multiple Neurenentzündung
(Polyneuritis) bei Hühnern
DTW 15, 417 - 421
- 121) Markham, F.S., H.R. Cox
and E. Berry (1961) Immunization with a mild
strain of laryngotrachei-
tis virus by various me-
thods
Poult. Sci. 40, 1427
- 122) Matsuoaka, T., T.M. Folkerts
and C. Gale (1972) Evaluation in calves of an
inactivated bovine rhino-
tracheitis and parainfluen-
za-3 vaccine combined with
pasteurella bacterin
J.A.V.M.A. 160, 333 - 337

- 123) May, H.G. and H.G. Tittsler
(1925)
Tracheo-laryngitis in
poultry
J.A.V.M.A. 67, 229 - 231
- 124) Mayr, A. (1970)
Schutzimpfung der Pferde
gegen Virusabort
Tierärztl. Umsch. 25,
111 - 114
- 125) Mayr, A. (1970)
Vaccination of horses
against equine herpesvi-
rus 1 infection
Proc. 2nd Int. Conf. Equine
Inf. Dis. , Paris 1969,
41 - 45 Verlag S. Karger:
Basel-München-New York
- 126) Mayr, A. und J. Pette
(1966)
Attenuierung von Rhinopneu-
monitisvirus des Pferdes
zur Herstellung eines Le-
bendimpfstoffes
Zbl. Bakt. I Ref. 206, 539
- 127) Mayr, A. und J. Pette
(1968)
Zur Differenzierung, Dia-
gnose und Bekämpfung virus-
bedingter Erkrankungen des
Pferdes unter besonderer
Berücksichtigung der hei-
mischen Krankheiten
Berl. Münch. tierärztl.
Wschr. 81, 372 - 378

- 128) Mayr, A. und J. Pette
(1968)
Premières expériences
faites concernant la
vaccination de chevaux
contre la rhino-pneumo-
nite (avortement viral)
avec un vaccin vivant pro-
venant de cultures de
cellules
Bull. Off. int. Epizoot.
70, Rap. 310
- 129) Mayr, A., J. Pette,
K. Petzoldt und
K. Wagener (1968)
Untersuchungen zur Ent-
wicklung eines Lebendimpf-
stoffes gegen die Rhino-
pneumonitis (Stutenabort)
der Pferde
Zbl. Vet. Med. B 15,
407 - 418
- 130) Mayr, A., P.A. Bachmann,
B. Bibrack und G. Wittmann
(1974)
Virologische Arbeitsmetho-
den Bd. I, 219
Verlag G. Fischer: Stuttgart
- 131) McFeely, R.A., A.M. Merrit
and E.L. Stearly (1968)
Abortion in a dairy herd
vaccinated for infectious
bovine rhinotracheitis
J.A.V.M.A. 153, 657 - 661
- 132) McGuire, T.C.,
T.B. Crawford and
J.B. Henson (1974)
Prevalence of antibodies
to herpesvirustypes 1 and
2, arteritis and infectious
anemia viral antigens in
equine serum
Am. J. Vet. Res. 35,
181 - 185

- 133) McKercher, D.G. (1962) The infectious bovine rhinotracheitis as a cause of abortion in cattle
Californ. Vet. 16, 24
- 134) McKercher, D.G. and G.L. Grenshaw (1971) Comparative efficacy of intranasally and parenterally administered infectious bovine rhinotracheitis vaccine
J.A.V.M.A. 159, 1362
- 135) Meszaros, I. (1971) Viruserkrankungen der Geschlechtsorgane von Besamungsbullen und ihre Bekämpfung durch Vakzination
DTW 78, 103
- 136) Mitchell, D. (1974) An outbreak of abortion in a dairy herd following inoculation with an intramuscular infectious bovine rhinotracheitis vaccine
Can. Vet. J. 15, 148 - 151
- 137) Molgard, P. and J. Cavett (1947) The feather follicle method of vaccinating with fowl laryngotracheitis vaccine
Poult. Sci. 26, 563 - 567
- 138) Mostow, S.R., S.C. Schwenbaum, W.R. Dowdle, M.T. Coleman and H.S. Kaye (1969) Studies with inactivated influenza vaccines purified by zonal centrifugation
Bull. WHO 41, 525

- 139) Mubiru, A. (1971) Untersuchungen über die Eignung vom komplementbindenden Rhinopneumonitisvirus-Antigen aus Zellkulturen und über die Antikörperbildung in Mäusen und Goldhamstern nach einer Impfung mit attenuiertem Rhinopneumonitisvirus
Med. Vet. Diss., München
- 140) Nazerian, K. J.J. Solomon, R.L. Witter and B.R. Burmester (1968) Studies on the etiology of Marek's disease
II Finding of a herpesvirus in cell culture
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 177 - 182
- 141) Nedjalkov, Str., St. Stoitschev, B. Ribarov und N. Stilova (1968) Versuche zur Herstellung von Vakzine gegen die Aujeszzkysche Krankheit aus inaktiviertem Virus
1. Mitteilung
Arch. Exp. Vet. Med. 22, 499 - 507
- 142) Nedjalkov, Str., R. Ribarov, N. Stoilova und K. Mermerski (1970) Versuche zur Gewinnung einer kombinierten Kristallviolettvakzine gegen Schweinepest und Aujeszzkysche Krankheit, 1. Mitteilung
Arch. Exp. Vet. Med. 24, 159 - 165

- 143) Neumann, W.H. and R.A. nicht publiziert
 Crandell (1960) Zit. nach Crandell, 1971
- 144) Norcross, M.A. and Experience with Marek's
 A.D. Rankin (1973) disease vaccine
 Poult. Sci. 52, 836 - 841
- 145) Okazaki, W., H.G. Purchase Protection against Marek's
 and B.R. Burmester (1970) disease by vaccination with
 a herpes virus of turkeys
 Av. Dis. 14, 413 - 429
- 146) Pette, J. (1966) Development of a living
 virus vaccine against rhino-
 pneumonitis of horses
 Proc. 1st Int. Conf. Equine
 Inf. Dis., Stresa, 1966,
 112 - 116
- 147) Petzoldt, K. (1967) Die Technik der Komplement-
 bindungsreaktion zur Diag-
 nose des Virusabortes der
 Stuten (Rhinopneumonitis)
 DTW 74, 252 - 255
- 148) Petzoldt, K. (1974) Equine Herpesvirusinfek-
 tionen
 Verlag G. Fischer: Jena
- 149) Pulsford, M.F. (1961) The epidemiology of in-
 fectious laryngotracheitis
 of poultry
 Aust. Vet. J. 37, 97 - 99
 272 - 273

- 150) Pulsford, M.F. (1963) Infectious laryngotracheitis of poultry
I. Virus variation, immunology and vaccination
Vet. Bull. 33, 415 - 420
- 151) Pulsford, M.F. and J. Stokes (1953) Infectious laryngotracheitis in South Australia
Aust. Vet. J. 29, 8 - 12
- 152) Pulsford, M.F., H.V. Chamberlain and J. Topham (1956) A preliminary note on infectious laryngotracheitis vaccination with virus of low virulence
Aust. Vet. J. 32, 138 - 141
- 153) Pulsford, M.F. and P.S. Watts (1961) Natural passive resistance of chickens from endemic areas to infection by infectious laryngotracheitis virus
Aust. Vet. J. 37, 314 - 316
- 154) Purchase, H.G. (1972) Recent advances in the knowledge of Marek's disease
Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 16, 223 - 258
- 155) Purchase, H.G., W. Okazaki and B.R. Burmester (1971) Field trials with the herpes virus of turkeys (HVT) strain FC 126 as a vaccine against Marek's disease
Poult. Sci. 50, 775 - 783

- 156) Purchase, H.G., W. Okazaki
and B.R. Burmester (1972)
The minimum protective dose
of the herpes virus turkeys
vaccine against Marek's
disease
Vet. Rec. 91, 79 - 84
- 157) Purchase, H.G., W. Okazaki
and B.R. Burmester (1972)
Long term field trials with
the herpesvirus of turkeys
vaccine against Marek's
disease
Av. Dis. 16, 57 - 71
- 158) Raggi, L.G., J.R. Brownell
and F.G. Steward (1961)
Effects of infectious
laryngotracheitis virus on
egg production and quality
Poult. Sci. 40, 134 - 140
- 159) Raggi, L.G. and G.C. Lee
(1965)
Infectious laryngotracheitis
outbreaks following vacci-
nation
Av. Dis. 2, 559 - 565
- 160) Raggi, L.G. and G.C. Lee
(1965)
Duration of immunity to
infectious laryngotracheitis
Poult. Sci. 44, 509 - 514
- 161) Rispens, B.H., H. van
Vloten and H.J.L. Maas
(1969)
Some virological and sero-
logical observations on
Marek's disease
Brit. Vet. J. 125, 445 - 453
- 162) Rispens, B.H., H. van
Vloten, N. Mastenbroek,
H.J.L. Maas and K.A. Schat
(1972)
Control of Marek's disease
in the Netherlands
I. Isolation of an avirulent
Marek's disease virus (strain
CVI988) and its use in labo-
ratory vaccination trials
Av. Dis. 16, 108 - 125

- 163) Rispens, B.H., H. van
Vloten, N. Mastenbroek,
H.J.L. Maas and K.A. Schat
(1972)
Control of Marek's disease
in the Netherlands
II. Field trials on vacci-
nation with an avirulent
strain (CVI988) of Marek's
disease virus
Av. Dis. 16, 126 - 138
- 164) Robinson, V.B., J.W.
Newberne and F.E. Mitchell
(1961)
Vaccination of pregnant
cattle with infectious
bovine rhinotracheitis
vaccine
Vet. Med. 56, 437 - 440
- 165) Röhrer, H. (1967)
Handbuch der Virusinfektio-
nen bei Tieren Bd. II,
Spez. Teil I, 1008 - 1010
Verlag G. Fischer: Jena,
1967
- 166) Rossi, C. und E. Beccaria
(1973)
Use of an inactivated
vaccine against respiratory
diseases of cattle
Atti Soc. Ital. Buiatr. 5,
206 - 211
- 167) Sampson, G.R., T. Mat-
suoka, R.D. Olson, J.A.
Miyat and L.V. Tonkinson
(1972)
Clinical appraisal of an
inactivated bovine rhino-
tracheitis / parainfluenza-3
vaccine with pasteurella
bacterin
Vet. Med. 67, 1354 - 1357

- 168) Saunders, J.R., S.M. Olson
and O.M. Radositits (1972) Efficacy of an intramus-
cular infectious bovine
rhinotracheitis vaccine
against abortion due to
the virus
Can. Vet. J. 12, 273 - 278
- 169) Schmidt, J. (1975) Vergleichende Wirksamkeits-
bestimmungen von Rinder-
grippeimpfstoffen im homo-
logen und heterologen Wirts-
system
Vet. Med. Diss., München
- 170) Schwarz, A.J.F.,
C.J. York, L.W. Zirbel
and L.A. Estela (1957) Modification of infectious
bovine rhinotracheitis virus
in tissue culture and deve-
lopment of a vaccine
Proc. Soc. Exp. Biol. Med.
96, 453 - 458
- 171) Schwarz, A.J.F., L.W.
Zirbel, L.A. Estela and
C.J. York (1958) Propagation and modification
of Infectious bovine rhino-
tracheitis (IBR) virus in
porcine kidney tissue culture
Proc. Soc. Exp. Biol. Med.
97, 680 - 683
- 172) Seagar, E.A. (1933) Pathology of fowl paralysis
with some aspects of its
cause and control
Harper Adams Miltity Poult. J.,
Aug. 1933

- 173) Sheffy, B.E. and S. Rodman
(1973)
Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis infection
J.A.V.M.A. 163, 850
- 174) Shibley, G.P., R.L.
Luginbuhl and F.C. Helmboldt (1962)
A study of infectious laryngotracheitis virus
I. Comparison of serologic and immunogenic properties
Av. Dis. 6, 59 - 71
- 175) Shibley, G.P., R.E.
Luginbuhl and F.C. Helmboldt (1963)
A study of infectious laryngotracheitis virus
II. The duration and degree of immunity induced by conjunctival vaccination
Av. Dis. 7, 184 - 192
- 176) Shimizu, T., R. Ishizaki
and R. Ishitani (1974)
Protection test of equine rhinopneumonitis in colts
Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth. 69, 1 - 4
- 177) Shimizu, T., R. Ishizaki
and T. Kumanomido (1974)
Combined immunizing effects of live and inactivated equine rhinopneumonitis virus in colts
Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth. 69, 5 - 8
- 178) Shimizu, T., C. Ushimi
and R. Ishitani (1974)
Antibody-forming effect in colts of inactivated vaccine produced from a partially purified preparation of equine rhinopneumonitis virus
Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth. 69, 9 - 12

- 179) Simmons, G.C., J.W. Ryley
and V.M. Macdonald (1954) Infectious laryngotracheitis
of poultry in Queensland
Aust. Vet. J. 30, 129 - 134
- 180) Škoda, R. (1962) A modified pseudorabies
virus suitable for immuni-
zation of cattle
Acta vir. 6, 189
- 181) Škoda, R. (1971) Der Nachweis von neutrali-
sierenden Antikörpern gegen
das Virus der Aujeszky'schen
Krankheit bei Schweinen in
Süddeutschland
Berl. Münch. tierärztl.
Wschr. 21, 411 - 414
- 182) Škoda, R., I. Brauner,
E. Sáddecký and J.
Somogyiová (1964) Immunization against
Aujeszky's disease with
live virus
II. Immunization of pigs
under laboratory conditions
Acta virol. 8, 123 - 134
- 183) Škoda, R., I. Brauner,
E. Sáddecký, J. Somogyiová
and O. Jamrichová (1966) Immunization against
Aujeszky's disease with
a live vaccine
III. Immunization of pigs
with the vaccine BUK in
field trials
Vet. Med. 11, 85 - 95
- 184) Škoda, R. und G. Wittmann
(1973) Die Immunisierung von Schweinen
mit Vakzinen aus inak-
tiviertem Aujeszky-Virus
Zbl. Vet. Med. B 20,
127 - 138

- 185) Smith, C.B., J.A. Bellanti
and R.M. Chanock (1967)
Immunglobulins in serum
and nasal secretions following
infection with type I para-
influenza virus and in-
jection of inactivated
vaccines
J. Immunol. 99, 133
- 186) Solomkin, P.S. (1952)
Die Prinzipien und Grundla-
gen des Kampfes gegen die
Aujeszkysche Krankheit bei
den landwirtschaftlichen
Nutztieren
Veterin. 10, 115
- 187) Solomon, J.J., R.L. Witter,
K. Nazerian and B.R. Bur-
mester (1968)
Studies on the etiology of
Marek's disease
I. Propagation of the agent
in cell culture
Proc. Soc. Exp. Biol. Med.
127, 173 - 177
- 188) Spearman, Kärber
in: Lothar Sachs: Statisti-
sche Auswertungsmethoden,
1968, 225 - 229
Verlag A. Springer: Berlin-
Heidelberg-New York
- 189) Spencer J.L., J.S. Gavora,
A.A. Grunder, A. Robertson
and G.W. Speckmann (1974)
Immunization against Marek's
disease: influence of strain
of chickens, maternal anti-
body, and type of vaccine
Av. Dis. 18, 33 - 44

- 190) Straub, O.C. (1972) Impfung gegen den Bläschen-
ausschlag und die Rhino-
tracheitis des Rindes
Tierärztl. Umsch. 27,
496 - 500
- 191) Straub, O.C. und Versuche mit einem Lebend-
N. Mäcke (1971) impfstoff gegen Bläschen-
ausschlag in einer Besa-
mungsstation
Berl. Münch. tierärztl.
Wchr. 24, 481 - 484
- 192) Straub, O.C., H. Frerking Impfung eines großen Rinder-
und R. Kramer (1973) bestandes gegen Bläschen-
ausschlag und Rhinotracheitis
DTW 80, 73 - 77
- 193) von Streng, A. (1972) Vergleichende Untersuchun-
gen über biologische, chemi-
sche und physikalische Unter-
schiede bei verschiedenen
Rhinopneumonitisvirusstämmen
Med. Vet. Diss. , München
- 194) Suhaci, I., M. Papadopol, Attenuation of the Bukarest
I. Cirstet and G. strain of Aujeszky's disease
Dumitrescu (1973) virus by serial passage on
chick-embryo fibroblast
culture
Arch. Vet. Rouman. 2,
127 - 142

- 195) Thein, P. (1974) Diagnose und Prophylaxe der wichtigsten Infektionskrankheiten des Respirationstraktes beim Pferd
Fol. Vet. Latina 4,
455 - 485
- 196) Thein, P. (1974) Schutzimpfung gegen Rhinopneumonitis unter besonderer Berücksichtigung der Virusausscheidung
Tierärztl. Umsch. 29,
363 - 366
- 197) Todd, J.D., F.J. Volenec and I.M. Paton (1971) Intranasal vaccination against infectious bovine rhinotracheitis: studies on early onset of protection and use of the vaccine in pregnant cows
J.A.V.M.A. 159, 1370 - 1374
- 198) Todd, J.D., F.J. Volenec and I.M. Paton (1972) Interferon in nasal secretions of calves after intranasal administration of avirulent infectious bovine rhinotracheitis virus: association of interferon in nasal secretions with early resistance to challenge with virulent virus
Inf. Immun. 5, 699 - 706

- 199) Tonewa, W. (1958) Die Aujeszkysche Krankheit
Staatsverlag Landwirtschafts-
literatur: Sofia 1958
- 200) Tripod-Böttcher, R. und
K. Petzoldt (1971) Serologische Untersuchungen
bei der Schutzimpfung gegen
den equinen Herpesvirus-
abort (Rhinopneumonitis)
Wien. tierärztl. Mschr. 58,
241 - 244
- 201) Tschumakov, V.P., A.G.
Bajinov und I.V. Savjagin
(1965) Primenenie beta propiolak-
tona v proisvotsve veteri-
narnich biopreparatov
Veterin. 42, 26
- 202) Uhr, I.W. and N.S.
Finkelstein (1963) Antibody formation
IV. Formation of rapidly
and slowly sedimenting
antibodies and immunolo-
gical memory to bacterio-
phage ϕ X-174
J.Exp. Med. 117, 457
- 203) Urushadze, A.Ya. (1964) Dry tissue virus-vaccine of
infectious laryngotracheitis
in poultry
Veterin. 41, 21
- 204) Vidor, T. (1973) Vergleichende Untersuchungen
über die Inaktivierung von
Reovirus, Serotyp 1, unter
Erhalt der immunisierenden
Eigenschaften
Vet. Med. Diss., München

- 205) Waldmann, R.H., J.A. Kasel, R.V. Fulk, Y. Togo, R.B. Hornick, G.G. Heiner, A.T. Dawkins and J.J. Mann (1968) Influenza antibody in human respiratory secretion after subcutaneous or respiratory immunization with inactivated virus Nature 218 , 594
- 206) Walton, T.E. and J.H. Gillespie (1970) Feline viruses VII. Immunity to the feline herpesvirus in kittens inoculated experimentally by the aerosol method Corn. Vet. 60, 233 - 239
- 207) Witter, R.L., J.J. Solomon and G.H. Burgoyne (1969) Cell culture techniques for primary isolation of Marek's disease associated herpesvirus Av. Dis. 13, 101 - 118
- 208) Witter, R.L., K. Nazerian, H.G. Purchase and G.H. Burgoyne (1970) Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus Am. J. Vet. Res. 31, 525
- 209) Wittmann, G., K. Bauer and M. Mussgay (1970) Versuche zur Schutzimpfung von Schweinen mit Vakzinen aus inaktiviertem Maul- und Klauenseuche (MKS)-Virus II. Versuche mit EEI-inaktiviertem Virus und DEAE-D als Adjuvans Arch. Virusforsch. 29, 139 - 158

- 210) Woese, C. (1960) Thermal inactivation of animal viruses
Ann. N.Y. Acad. Sci. 83, 4
- 211) York, C.J. (1957) Infectious bovine rhinotracheitis - A preliminary report on the development of a vaccine
All. vet. 6-9, 25 - 26
- 212) York, C.J. and A.J.F. Schwarz (1956) Immunological studies on infectious bovine rhinotracheitis
Proc.U.S.Livestock San.A.60 th Ann.Meeting, 149 - 154
- 213) York, C.J., A.J.F. Schwarz L.W. Zirbel and B.S. Estela (1958) Infectious bovine rhinotracheitis vaccine efficacy in controlled field trials
Vet. Med. 53, 522 - 524
- 214) ^vŽuffa, A. (1963) Immunisierung gegen die Aujeszkysche Krankheit I. Gewinnung des modifizierten Virus der Aujeszkyschen Krankheit
Arch. Exp. Vet. Med. 17, 1325 - 1344
- 215) ^vŽuffa, A. (1963) Versuche zur Immunisierung von Laboratoriumstieren und Schweinen mittels Formaldehyd- und UV-Strahleninaktiviertem Aujeszkys-Virus
Arch. Exp. Vet. Med. 17, 595 - 613

- 216) Žuffa, A. (1964)
Immunisierung gegen die
Aujeszzkysche Krankheit
IV. Einige immunologische
Eigenschaften des modifizier-
ten Virus der Aujeszzkyschen
Krankheit
Arch. Exp. Vet. Med. 18,
1099 - 1117
- 217) Žuffa, A. (1972)
Immunogenicity of the
avirulent clone BUK-TK-300/9,2
of the Aujeszky's (pseudo-
rabies) virus in sheep
Acta Vet., Brno 41, 67-74
- 218) Žuffa, A. und
V. Dlhy (1964)
Immunisierung gegen die
Aujeszzkysche Krankheit
VI. Immunisierung von Rin-
dern mit dem modifizierten
Virus der Aujeszzkyschen
Krankheit
Mh. Vet. Med. 19, 801
- 219) Žuffa, A. and
I. Matis (1970)
The loss of antigenicity
of Aujeszky's disease virus
inactivated by heating in
the presence of $MgCl_2$
Vet. Čas. (Košice) 13,
101 - 109
- 220) Žuffa, A., I. Banda
and J. Konrad (1972)
Combined vaccination of
mink against Aujeszky's
disease and botulism
Zbl. Vet. Med. B 19,
728 - 738

- 221) Zuschek, F. and
T.E. Chow (1961)
Immunogenicity of 2 infectious bovine rhinotracheitis vaccines
J.A.V.M.A. 139, 236 - 237
- 222) Zygraich, N. and
C.Huygelen (1972)
Inoculation of one-day-old chicks with different strains of turkey herpesvirus
I. Serological studies
Av. Dis. 16, 735 - 740
- 223) Zygraich, N. and
C. Huygelen (1972)
Inoculation of one-day-old chicks with different strains of turkey herpesvirus
II. Virus replication in tissues of inoculated animals
Av. Dis. 16, 793 - 798
- 224) Zygraich, N. and
C. Huygelen (1973)
Vaccination of chicks from immunized flocks with lyophilized turkey herpesvirus
Vet. Rec. 91, 373
- 225) Zygraich, N., M. Lobmann,
E. Vascoboinic and
E. Berge (1974)
In vivo and in vitro properties of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus
Res. Vet. Sci. 16, 328 - 335

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr danke ich hiermit für die freundliche Überlassung des Themas und die stets gewährte Förderung, die die Erstellung der Dissertation ermöglicht hat.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Peter Thein für seine jederzeit bereitwillig gewährte freundschaftliche Unterstützung bei den Untersuchungen aussprechen. Gleichzeitig danke ich auch seiner technischen Assistentin Fräulein G. Härtl.

Lebenslauf

Am 22. Mai 1949 wurde ich, Regine Scheid, als Tochter des Prof. Dr. med. Werner Scheid und der Dr. med. Elisabeth Scheid, geb. Jeremias, in Hamburg geboren.

Von 1955 bis '59 besuchte ich die Städtische Volksschule Lindener-Allee in Köln.

1959 wurde ich in die Staatliche Hildegard-von-Bingen-Schule in Köln aufgenommen, wo ich am 3. Juli 1967 das Abitur bestand.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität in Gießen. Seit dem zweiten klinischen Semester studierte ich dann an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich am 18. August 1970 den ersten, am 28. September 1971 den zweiten und im Oktober 1972 den dritten Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung bestand. Im Dezember 1972 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt. Seit November 1972 arbeitete ich als Doktorandin im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin des Fachbereichs Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

